

Ökologie und Umweltsicherung

34/2011

Rekultivierung von
Rückstandshalden der Kaliindustrie

- 7 -

Untersuchung von
pflanzenwachstums-fördernden
Rhizobakterien sowie deren
Nutzbarkeit in der Rekultivierung
einer Rückstandshalde der
Kaliindustrie

Sebastian Koch

Ökologie und Umweltsicherung

34/2011

Rekultivierung von
Rückstandshalden der Kaliindustrie

- 7 -

Untersuchung von
pflanzenwachstums-fördernden
Rhizobakterien sowie deren
Nutzbarkeit in der Rekultivierung
einer Rückstandshalde der
Kaliindustrie

Sebastian Koch

Fachgebiet Mikrobiologie,
Fachbereich 10 - Mathematik und
Naturwissenschaften

Herausgeber: Universität Kassel
Fachbereich Ökologische Agrarwissenschaften
Fachgebiet Landschaftsökologie und Naturschutz
Steinstr. 21
37213 Witzenhausen

Schriftleitung: Prof. Dr. H. Schmeisky

Die vorliegende Arbeit wurde als Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) am Fachbereich Mathematik und Naturwissenschaften an der Universität Kassel angefertigt.

Erster Gutachter: Prof. Dr. F. Schmidt
Fachgebiet Mikrobiologie
Zweiter Gutachter: Prof. Dr. H. Schmeisky
Fachgebiet Landschaftsökologie und Naturschutz

Tag der mündlichen Prüfung: 19.8.2010

Bibliografische Information Der Deutschen Bibliothek
Die Deutsche Bibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar

Zugl.: Kassel, Univ., Diss. 2010
ISSN 0943-7223
ISBN print: 978-3-89958-934-4
ISBN online: 978-3-89958-935-1
URN: <http://nbn-resolving.de/urn:nbn:de:0002-39352>

2011, kassel university press GmbH, Kassel
www.uni-kassel.de/upress

Druck und Verarbeitung: Unidruckerei der Universität Kassel
Printed in Germany

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung	1
1.1 Rekultivierung der Rückstandshalde Sigmundshall	1
1.1.1 Die Rückstandshalde	1
1.1.2 Ummantelung der Halde mit dem Abdecksubstrat REKAL/SAV	2
1.1.3 Probleme der Begrünungsmaßnahmen	4
1.2 Pflanzenwachstums-fördernde Rhizobakterien	5
1.2.1 Rhizosphäre und Rhizosphärenkompetenz	6
1.2.2 Pflanzenwachstums-Förderung durch Biokontrolle	6
1.2.3 Pflanzenwachstums-Förderung durch Nährstoffbereitstellung	9
1.2.4 Pflanzenwachstums-Förderung durch Phytostimulation	11
1.2.5 Nutzung von pflanzenwachstums-fördernden Rhizobakterien	13
1.3 Zielsetzung	17
2. Material & Methoden	18
2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien	18
2.2 Chemikalien	19
2.3 Lösungen	20
2.4 Nährmedien	22
2.5 Bakterienstämme und antimikrobielle Agenzien	25
2.6 Material für Pflanzenversuche	26
2.7 Material für molekularbiologische Arbeiten	27
2.8 Isolierung und Charakterisierung von Rhizobakterien	28
2.8.1 <i>In situ</i> Probenahmen	28
2.8.2 Probenbearbeitung	28
2.8.3 Erste Charakterisierung der Rhizobakterien	29
2.8.4 Nachweis der Phosphatsolubilisierung	30
2.8.5 Nachweis der Siderophorenproduktion	31
2.8.6 Nachweis der ACC Deaminase-Aktivität	31
2.8.7 Nachweis der Auxinproduktion	31
2.8.8 Nachweis der Zugehörigkeit zum Genus <i>Pseudomonas (sensu stricto)</i>	32
2.8.9 Erstellung von genetischen <i>fingerprints</i> mittels rep-PCR	32
2.8.10 Analyse von Gensequenzen	33
2.9 Untersuchung der Rhizobakterien anhand von Pflanzenversuchen	34
2.9.1 Markierung von Bakterien mit spontanen Antibiotika-Resistenzen	34
2.9.2 Oberflächensterilisation der Grassamen	34
2.9.3 Inokulation der Grassamen	34
2.9.4 Herstellung der Alginat-Kugeln	35
2.9.5 Durchführung und Aufbau der Gewächshausversuche	36
2.9.6 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung	39
2.9.7 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung	41
2.9.8 Untersuchung zur Zelldichteabhängigkeit der Wachstumsförderung	42
2.10 Genauere Untersuchung des Isolats 2.2	43
2.10.1 Sequenzierung ribosomaler DNA	43
2.10.2 Phylogenetische Analysen	44
2.10.3 Weitere Identifizierungs- und Charakterisierungsmaßnahmen	44

2.10.4 Untersuchungen zur ACC Deaminase	46
2.10.5 Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Wachstumsförderung	48
2.11 Statistische Auswertung der Ergebnisse	50
3. Ergebnisse	51
3.1 Erste Probenahme	51
3.2 Zweite Probenahme	52
3.3 Auswahl und weitere Untersuchung geeigneter Isolate	53
3.3.1 Charakterisierung interessanter Isolate	53
3.3.2 Untersuchung auf PGPR-Eigenschaften	54
3.4 Erster Gewächshausversuch mit den Isolaten 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8	56
3.6 Zweiter Gewächshausversuch mit Isolat 2.2	58
3.7 Dritter Gewächshausversuch mit Isolat 2.2	65
3.5 Weiterführende Untersuchungen des Isolats 2.2	68
3.5.1 Identifizierung anhand der ribosomalen DNA	68
3.5.2 Weitere Differenzierungsmaßnahmen	71
3.5.3 Untersuchung physiologischer Eigenschaften	72
3.8 <i>In vitro</i> Pflanzenversuche mit Isolat 2.2	75
3.9 Mikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung durch Isolat 2.2	76
3.9.1 Fluoreszenz-Mikroskopie	76
3.9.2 Rasterelektronenmikroskopie	78
3.10 Untersuchung des Enzyms ACC Deaminase	80
3.10.1 Sequenzanalyse	80
3.10.2 Massenspektrometrische Untersuchung	80
3.11 Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Wachstumsförderung	82
4. Diskussion	84
4.1 Isolierung und Charakterisierung der Rhizobakterien	85
4.1.1 Hintergrund der Probenahmen	85
4.1.2 Erste Untersuchungen der Isolate	86
4.1.3 Auswahl und weitere Untersuchung geeigneter Isolate	88
4.2 Beurteilung der Rhizobakterien anhand von Pflanzenversuchen	91
4.2.1 Qualitativer Vergleich der drei Gewächshausexperimente	91
4.2.2 Darstellung der Phosphor-Problematik anhand des ersten Experiments	93
4.2.3 Vergleich und Beurteilung verschiedener Applikationsmethoden	95
4.2.4 Beurteilung des Isolats 2.2 bei Nutzung anderer Substrate	99
4.2.5 Mögliche Bedeutung der applizierten Zellzahlen	100
4.3 Identifizierung und Beurteilung des Isolats 2.2	103
4.3.1 Identifizierung durch Sequenzierungsmaßnahmen	103
4.3.2 Identifizierung anhand weiterer Differenzierungsmaßnahmen	104
4.3.3 Beurteilung der Wurzelbesiedlung	106
4.3.4 Untersuchungen des Wirkmechanismus der Pflanzenwachstums-Förderung	109
4.3.5 Beurteilung des Isolats 2.2 zur Nutzung in den Rekultivierungsmaßnahmen	112
5. Zusammenfassung	115
6. Ausblick	117
7. Abstract	119
Literaturverzeichnis	120
Anhang	136

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Prinzip der Reduktion von Haldenwasser durch Abdeckung und Rekultivierung.....	4
Abb. 2: Wirkmechanismen von pflanzenwachstums-fördernden Rhizobakterien.....	7
Abb. 3: 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG).....	9
Abb. 4: Indol-3-Essigsäure (IAA).....	33
Abb. 5: Übersichtskarte der Rückstandshalde des Kaliwerks Sigmundshall.....	4:
Abb. 6: Schematische Darstellung der rDNA-assoziierten PCR-Protokolle	65
Abb. 7: Phosphatsolubilisierungs-Leistung der Isolate der ersten Probenahme	73
Abb. 8: Phosphatsolubilisierungs-Leistung der Isolate der zweiten Probenahme	74
Abb. 9: <i>Fingerprint</i> -PCR der acht Isolate mit ACC Deaminase-Aktivität.....	75
Abb. 10: Phosphatsolubilisierungs-Leistung der Isolate unter verschiedenen Pufferungen....	77
Abb. 11: Auxin-Synthese der Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8	77
Abb. 12: Auswirkung der Düngung auf das Wachstum von <i>L. perenne</i>	78
Abb. 13: Auswirkung der Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8 auf das Wachstum von <i>L. perenne</i>	79
Abb. 14: Auswirkung verschiedenartiger Alginat-Kugeln auf das Wachstum von <i>L. perenne</i> 7:"	
Abb. 15: Auswirkung der Menge an Alginat-Kugeln auf das Wachstum von <i>L. perenne</i>	7;
Abb. 16: Förderung des Wachstums von <i>Lolium perenne</i> durch Isolat 2.2	82
Abb. 17: Auswirkung einer Sameninokulation auf das Wachstum von <i>L. perenne</i>	82
Abb. 18: Auswirkung einer zweiten Inokulation auf das Wachstum von <i>L. perenne</i>	83
Abb. 19: Auswirkung des Isolats 2.2 auf das Wurzelwachstum von <i>L. perenne</i>	84
Abb. 20: Addierte Trockenmassen ausgewählter Varianten.....	85
Abb. 21: Auswirkung des Isolats 2.2 auf <i>L. perenne</i> unter Kompostzusatz	85
Abb. 22: Auswirkung des Isolats 2.2 auf das Wachstum von <i>L. perenne</i> in Ackerboden	86
Abb. 23: Wachstumskurven der Stämme 2.2 und 2.2 Rif ^r Sm ^r	65
Abb. 24: Auswirkung verschiedener Inokulationen auf das Wachstum von <i>L. perenne</i>	66
Abb. 25: Auswirkung des Isolats 2.2 auf das Wachstum von ungedüngtem Weidelgras.....	66
Abb. 26: Evolutionäres Verhältnis von Isolat 2.2 zu 34 <i>Pseudomonas</i> -Typstämmen (ME) ...	69
Abb. 27: Evolutionäres Verhältnis von Isolat 2.2 zu 34 <i>Pseudomonas</i> -Typstämmen (NJ)....	70
Abb. 28: Wachstum von Isolat 2.2 mit ACC als Stickstoffquelle.....	73
Abb. 29: Auxin-Synthese des Isolats 2.2 unter verschiedenen Bedingungen (normalisiert)...	73
Abb. 30: Auxin-Synthese des Isolats 2.2 unter verschiedenen Bedingungen (absolut).....	74
Abb. 31: Zelldichteabhängige Pflanzenwachstums-Förderung von Isolat 2.2.....	75
Abb. 32: Wachstumskurven der Stämme 2.2 und 2.2 (pSM1890)	76
Abb. 33: Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung durch Isolat 2.2 ...	77
Abb. 34: Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung durch Isolat 2.2	79
Abb. 35: Gesamtprotein des Isolats 2.2 mit ACC als Stickstoffquelle	80
Abb. 36: Auxin-Synthese der Transposon-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp.....	82
Abb. 37: Einfluss der Transposon-Mutanten auf das Wachstum von <i>L. perenne</i>	83
Abb. 38: Wachstum von <i>Lolium perenne</i> auf verschiedenen Substraten.....	84
Abb. 39: Durch Isolat 2.2 hervorgerufene Ertragssteigerungen (zusammengefasst).....	97
Abb. 40: Möglicher Zusammenhang zwischen Zellzahl und Ertragssteigerung <i>in vivo</i>	101

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Spurenelement-Gehalte von Abdecksubstrat und normalen Böden	4
Tab. 2: Auswahl der genutzten bzw. untersuchten Bakterienstämme.....	25
Tab. 3: Genutzte antimikrobielle Agenzien	25
Tab. 4: Verwendete PCR-Primer	27
Tab. 5: Aufbau des ersten Gewächshausversuchs.....	37
Tab. 6: Aufbau des zweiten Gewächshausversuchs.....	38
Tab. 7: Aufbau des dritten Gewächshausversuchs.....	39
Tab. 8: 16S rDNA-Sequenzen verschiedener <i>Pseudomonas</i> -Typstämme	45
Tab. 9: Nährstoffgehalte der oberirdischen Trockenmasse (erster Gewächshausversuch).....	57
Tab. 10: Nährstoffgehalte der oberirdischen Trockenmasse (zweiter Gewächshausversuch). 61	
Tab. 11: Nährstoffgehalte der oberirdischen Trockenmasse (dritter Gewächshausversuch)...	67
Tab. 12: 16S rDNA-Sequenzübereinstimmungen von Isolat 2.2 mit anderen Stämmen.....	68
Tab. 13: Spezies-Übereinstimmung der Fettsäureanalyse	71
Tab. 14: Verwertung von Kohlenstoffquellen durch das Isolat 2.2 anhand des API 50 CH ...	72
Tab. 15: Dunnett-Test des Pflanzenversuchs unter Zelldichteabhängigkeit	75
Tab. 16: Auswahl der Peptidübereinstimmungen des Ansatzes in Medium ohne ACC.....	81
Tab. 17: Auswahl der Peptidübereinstimmungen des Ansatzes in Medium mit ACC	81
Tab. 18: Dunnett-Test des Pflanzenversuchs mit Transposon-Mutanten	83
Tab. 19: Parameter des eingesetzten Abdecksubstrats aller drei Gewächshausversuche	92
Tab. 20: Pflanzliche Phosphor-Aufnahme (erster Gewächshausversuch)	94
Tab. 21: Genutzte Inokulationsmethoden und dabei applizierte Zellzahlen.....	101
Tab. 22: Datenbankabgleich der 16 S rDNA-Sequenz der vier Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8	136
Tab. 23: Einzelreaktionen der Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8 in API 20 NE.....	137
Tab. 24: Erster Gewächshausversuch, Rohdaten (100 d).....	138
Tab. 25: Zweiter Gewächshausversuch, Rohdaten (105, 135, 217 d).....	139
Tab. 26: Dritter Gewächshausversuch, Rohdaten (105 d)	141
Tab. 27: Stoffwechseleigenschaften des Isolats 2.2 nach VITEK® 2	142
Tab. 28: Antibiotogramm des Isolats 2.2 nach VITEK® 2.....	143
Tab. 29: Antibiotogramm des Isolats 2.2 (gemäß CLSI, Jan. 2008).....	143

Abkürzungsverzeichnis

ACC	1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure
AHL	<i>N</i> -Acylhomoserinlacton
ALRP	aluminum recycling by-product
ARDRA	amplified rDNA restriction analysis
AS	Aminosäure(n)
BCA	biological control agent
bp	Basenpaar(e)
CAS	Chromazurol S
Cm	Chloramphenicol
CFU	colony forming unit(s)
CNN	competition for nutrients and niches
d	Tag(e)
DAPG	2,4-Diacetylphloroglucinol
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese
dNTP	Desoxyribonukleotid
DRMO	deleterious rhizosphere microorganisms
dt	Dezitonne(n)
ERIC	enterobacterial repetitive intergenic consensus
FAME	fatty acid methyl ester
FGDP	flue gas desulfurization by-product
FS	Frischsubstanz
<i>g</i>	Schwerebeschleunigung
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
Gm	Gentamycin
H	Hauptwurzel
ha	Hektar
IAA	indole-3-acetic acid
ISR	induced systemic resistance
ITS	internal transcribed spacer
kDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
L	Liter

ME	Minimum Evolution
NBRIP	National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NI	Standard-I-Nährmedium
NJ	Neighbor Joining
nt	Nukleotid(e)
OD _x	Optische Dichte bei x nm
PCR	polymerase chain reaction
PGPR	plant growth-promoting rhizobacteria
PQQ	pyrroloquinolin quinone
QS	Quorum Sensing
REKAL	Rezyklierung von Kalium und Aluminium
REM	Rasterelektronen-Mikroskop
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
Rif	Rifampicin
rpm	rotations per minute
RT	Raumtemperatur
S	Spross
SAR	systemic acquired resistance
SAV	Sprühabsorptionsverfahren
SI	Sigmundshall
Sm	Streptomycin
TCP	Tricalciumphosphat
TRFLP	terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
Trp	Tryptophan
TS	Trockensubstanz
VBNC	viable but notculturable
VOC	volatile organic compound
W	Gesamtwurzeln
YIB	yield increasing bacteria

1. Einleitung

1.1 Rekultivierung der Rückstandshalde Sigmundshall

1.1.1 Die Rückstandshalde

Die K+S Aktiengesellschaft unterhält zur Zeit sechs Standorte in Deutschland, in denen unterirdische Kalivorkommen abgebaut werden. Eine dieser Förderstätten ist das Werk Sigmundshall (SI) in Bokeloh in der Nähe von Hannover. Die Rohsalze, die hier momentan gefördert werden, bestehen zu 18% aus Sylvin (KCl) und zu 13% aus Kieserit ($\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Steinsalz (NaCl) macht den Großteil des restlichen Salzvorkommens aus. Jährlich werden 2,6 Mio. t der Rohsalze gefördert, woraus insgesamt 0,8 Mio. t Sylvin und Kieserit extrahiert und nach der Aufbereitung größtenteils als Dünger, aber auch für andere industrielle Anwendungen verkauft werden. Von den verbleibenden Rückständen liegen 0,2 Mio. t in flüssiger Form vor, der restliche Anteil von 1,6 Mio. t ist fest. Etwa ein Drittel hiervon (0,5 Mio. t) kann wieder unter Tage als Versatz eingelagert werden, der Rest des Abraums mit einer jährlich anfallenden Menge von 1,1 Mio. t bedarf jedoch einer oberirdischen Lagerung. Dies hat bis zum Frühjahr des Jahres 2010 zu einer Anhäufung des Kalirückstands von insgesamt etwa 37 Mio. t geführt (K+S Aktiengesellschaft, pers. Kommunikation). Der Rückstand der Halde SI besteht zum größten Teil aus NaCl (94,8%), den Rest machen KCl (2,6%), MgCl_2 (0,8%), MgSO_4 (0,2%) sowie unlösliche Bestandteile wie Gips (CaSO_4) und Ton (zusammen 1,6%) aus (Schmeisky & Lenz 1998).

Problembehaftet sind Salzhalden wie die des Werks Sigmundshall deswegen, weil Niederschläge im reinen Kalirückstand der Halde aufgrund dessen niedriger Feldkapazität nur in geringem Maße gespeichert werden und somit nur maximal etwa ein Drittel des Niederschlagswassers wieder verdunsten kann (Diekmann 2002). Infolgedessen kommt es durch das übrige Wasser zu einer Auswaschung des Salzes, und das entstehende sogenannte Haldenwasser (eine Salzlösung nahe der Sättigung) stellt eine ökologische Belastung dar. Das abfließende Salzwasser wird zunächst in einem die Halde umschließenden Ringgraben gesammelt und muss anschließend entsorgt werden (siehe Abb. 1, links). Im Fall der Halde Sigmundshall erfolgt dies durch Ableitung des Wassers in den Fluss Leine, wobei im Jahr 2009 knapp 133000 m³ Haldenwasser anfielen (K+S Aktiengesellschaft, pers. Kommunikation).

1.1.2 Ummantelung der Halde mit dem Abdecksubstrat REKAL/SAV

Als eine mögliche Lösung zur Reduzierung des Haldenwassers bietet sich die Abdeckung der Rückstandshalden an, die die niederschlagsbedingten Salzauswaschungen vermindern soll. Untersuchungen hierzu haben gezeigt, dass eine natürliche Ummantelung der Halden mittels einer Schicht aus flexiblem, begrünbarem Bodenmaterial und darauf angelegter durchgängiger Vegetationsschicht am geeignetsten ist (Schmeisky et al. 1993, Schmeisky & Lenz 1998, Hermsmeyer et al. 2002a). So kann mehr Niederschlagswasser im Abdeckmaterial gespeichert und auch über Evapotranspiration wieder in die Luft abgegeben werden, wodurch sich die Menge des jährlich anfallenden Haldenwassers stark verringern ließe (siehe Abb. 1, rechts).

Die steilen Hänge der Rückstandshalden mit Steigungen von 35 bis 40° machen allerdings eine Ummantelung durch Aufschüttung von verschiedenen Böden problematisch: von Materialien wie Erde oder auch Bauschutt muss aufgrund der geringeren spezifischen Schüttwinkel der Substrate entsprechend viel über die Haldenflanken aufgebracht werden, damit die Decke stabil bleibt und nicht abrutscht und das Salz wieder freilegt. Bei einer ausreichend standfesten Abdeckung der Halde auf diesem Wege würde sich jedoch auch die Grundfläche der gesamten Halde fast verdoppeln, was aufgrund der nahe gelegenen Werksgebäude und Infrastruktur nicht zu realisieren ist (Diekmann 2002).

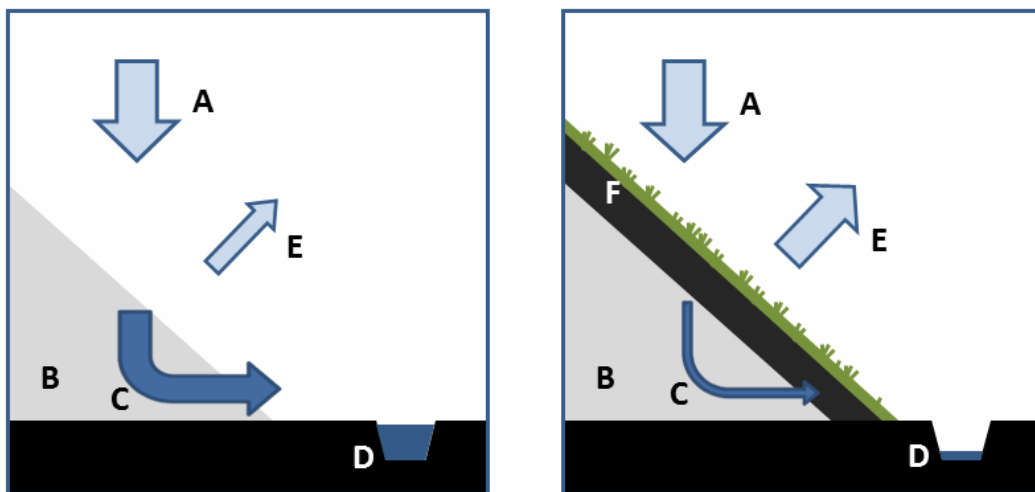


Abb. 1: Prinzip der Reduktion von Haldenwasser durch Abdeckung und Rekultivierung

links: Niederschlag (A) wäscht aus der unbedeckten Halde (B) Salz aus und das entstehende Haldenwasser (C) muss in Ringgräben gesammelt (D) und weggeleitet werden. Nur ein geringer Teil des Niederschlags verdunstet (E).

rechts: Die Abdeckung der Halde (B) mit einem geeigneten Substrat und einer darauf angelegten Vegetationsschicht (F) sorgt für erhöhte Wasserspeicherkapazität und ein größerer Teil des gespeicherten Niederschlags (A) wird über Evapotranspiration abgegeben (E). Die anfallende Menge des Haldenwassers (C, D) wird reduziert. Schematische Darstellung, modifiziert nach Wöhler (1999).

Mitarbeiter der Universitäten von Kassel und Hannover konnten zusammen mit der K+S Aktiengesellschaft nach umfangreichen Versuchsreihen ein geeignetes technogenes Abdecksubstrat entwickeln, das auch in vergleichsweise dünner Schichtung stabil auf den steilen Haldenflanken verbleibt, zudem eine hohe Wasserspeicherkapazität aufweist und sich auch begrünen lässt (Wöhler 1999, Scheer 2001, Hermesmeyer et al. 2002a, 2002b, 2002c). Dieses Abdeckmaterial setzt sich aus den zwei Komponenten REKAL und SAV-Stabilisat im Volumenverhältnis 7 : 3 zusammen.

Bei REKAL handelt es sich um Rückstände der sekundären Aluminiumindustrie in Form von Salzsclacken, der Begriff leitet sich von der Bezeichnung "Rezyklierung von Kalium und Aluminium" ab (Wöhler 1999). Es wird auch als *aluminum recycling by-product* (ALRP) bezeichnet (Hermesmeyer et al. 2002a). Die Aufbereitung dieser Salzsclacken, d.h. die Extraktion von Aluminiumresten und KCl findet vor Ort im Werk Sigmundshall statt, und der verbleibende Rückstand wird nach dem Mischen mit SAV direkt zur Abdeckung der Halde eingesetzt. Das REKAL weist anfangs einen hohen Salzgehalt auf, der etwa im Bereich von 50% liegt. Der entsalzte Rückstand enthält (jeweils ca.) 44% Korund-ähnliche Substanz, 32% Mg-Al-Spinell-ähnliches Material, 6% Al-Silikat, 10% Quarz, 5% Flussspat, 1% Natriumsilikat, 0,6% Ba, Sr-Carbonat und 0,5% Schwermetalle (Diekmann 2002).

Das beigemischte SAV-Stabilisat (abgeleitet vom Begriff Sprühabsorptionsverfahren) ist ein Produkt der Steinkohleverstromung und setzt sich aus Flugasche und Rauchgasentschwefelungsprodukt zusammen (Wöhler 1999). Es besteht hauptsächlich aus SiO₂, CaO (gesamt), S (gesamt als SO₃) und Al₂O₃, sowie aus geringeren Mengen von u.a. Fe₂O₃, K₂O, MgO, Na₂O, TiO₂ und P₂O₅ (Niessing 2005). Eine andere Bezeichnung für das SAV ist *flue gas desulfurization by-product* (FGDP) (Hermesmeyer et al. 2002a). Das SAV sorgt vor allem aufgrund puzzolanischer Effekte für die Erhöhung der Standfestigkeit des REKAL/SAV-Gemisches auf den steilen Haldenflanken (Wöhler 1999, Scheer 2001).

Wegen des vom REKAL verursachten hohen Salzanteils der Mischung von 35,5% (Hermesmeyer et al. 2002a) muss das fertige Abdecksubstrat nach der Aufschüttung zunächst auf den Haldenflanken ein bis zwei Jahre liegen und bewässert werden, damit in den obersten Schichten die phytotoxischen Salzkonzentrationen bis zur Begrünbarkeit verringert werden (Scheer 2001, Niessing 2005). Dann kann mit dem Anlegen einer Vegetationsschicht begonnen werden, damit letztendlich ein Auswaschen des Kalirückstands durch Niederschlag weiter reduziert werden kann. Im Jahr 2008 konnte so an abgedeckten Teilen der Rückstandshalde Sigmundshall das Haldenwasser um bis zu 90% reduziert werden (K+S Aktiengesellschaft 2008).

1.1.3 Probleme der Begrünungsmaßnahmen

Sowohl im Gewächshaus als auch direkt auf der Halde SI konnte das entsalzte Abdecksubstrat zwar erfolgreich bepflanzt werden, die angezogenen Pflanzen zeigten teilweise jedoch trotz intensiver Düngung Mangelerscheinungen, besonders was das Nährelement Phosphor angeht (Scheer 2001, Niessing 2005). Aufgrund des alkalischen pH-Werts (8,0 bis 8,5) und des hohen Calciumgehalts von 7 bis 8% im entsalzten Gemisch der Substanzen REKAL und SAV-Stabilisat kommt es sehr wahrscheinlich zur Ausfällung des ausgebrachten Phosphat-Düngers, was diesen in schwerer löslichen Formen wie z.B. Apatiten festlegt und dann letztendlich nicht mehr für die Pflanzen verfügbar macht (Scheer 2001).

Auch könnten die im Gemisch vorhandenen Spurenelemente Probleme bei der Rekultivierung verursachen. Wie Tab. 1 zu entnehmen ist, liegen die Gehalte von Chrom, Nickel, Blei, Zink und vor allem Kupfer teilweise weit über den sonst in normalen Böden nachweisbaren Mengen, was negative Auswirkungen auf das Pflanzenwachstum haben könnte (Foy et al. 1978). Daneben stellen z.B. witterungsbedingte zeitweilige Erhöhungen des Chlorid-Gehalts im Substrat, sowie die generell an Rückstandshalden zu findenden extremen Standortbedingungen wie zum Teil hohe Sonneneinstrahlung und Windgeschwindigkeiten Probleme für die sich etablierende Vegetationsschicht dar (Schmeisky & Lenz 1998, Niessing 2005).

Insgesamt ergibt sich die Frage, wie die Begrünungsmaßnahmen unterstützt werden könnten, um schneller zu einer Reduzierung des Haldenwassers zu gelangen.

Tab. 1: Spurenelement-Gehalte von Abdecksubstrat und normalen Böden

a) nach Scheffer & Schachtschabel (2002), b) nach Scheer (2001)

Spurenelement	Gehalt in natürlichen Böden ^a	Gehalt im Abdecksubstrat REKAL/SAV ^b
Eisen (Fe)	0,2-5%	1,5-1,6%
Mangan (Mn)	40-3000 ppm	1300 ppm
Silizium (Si)	1-60 mg L ⁻¹	307-352 ppm
Chrom (Cr)	5-300 ppm	367-412 ppm
Nickel (Ni)	5-50 ppm	308-357 ppm
Blei (Pb)	2-60 ppm	272-296 ppm
Zink (Zn)	10-80 ppm	868-985 ppm
Cadmium (Cd)	0,5-3 ppm	< 4 ppm
Kupfer (Cu)	2-40 ppm	3108-3672 ppm
Quecksilber (Hg)	0,05-0,5 ppm	0,1-0,2 ppm

1.2 Pflanzenwachstums-fördernde Rhizobakterien

Der förderliche Einfluss, den Bakterien und hier besonders die Knöllchenbakterien (Rhizobien) auf das Wachstum von Pflanzen nehmen können, ist schon seit weit über einem Jahrhundert bekannt und Thema der Forschung; eine Übersicht hierüber gibt z.B. Bashan (1998). Der Begriff "pflanzenwachstums-fördernde Rhizobakterien" (*plant growth-promoting rhizobacteria*, PGPR) hingegen wurde erst vor ca. 30 Jahren von Kloepper & Schroth (1978) geprägt, wobei hierunter zunächst nur fluoreszierende Pseudomonaden mit antagonistischer Wirkung gegenüber mikrobiellen Pflanzenpathogenen zusammengefasst wurden.

Heute gilt der Begriff allgemein für Bakterien, die sich in der Rhizosphäre (siehe Abschnitt 1.2.1) ansiedeln und über diverse Mechanismen zur Verminderung von Schädlingseinflüssen (Abschnitt 1.2.2), Bereitstellung von Nährstoffen (Abschnitt 1.2.3) und/oder direkten Wachstumsstimulation (Abschnitt 1.2.4) verfügen und so förderliche Effekte auf Wachstum und Gesundheit der Pflanzen ausüben können (siehe Abb. 2). Neben den bereits erwähnten Rhizobien und Pseudomonaden können hierzu auch Vertreter verschiedenster Gattungen wie u.a. *Azospirillum*, *Bacillus* und *Enterobacter* zählen (Bashan & de-Bashan 2005a).

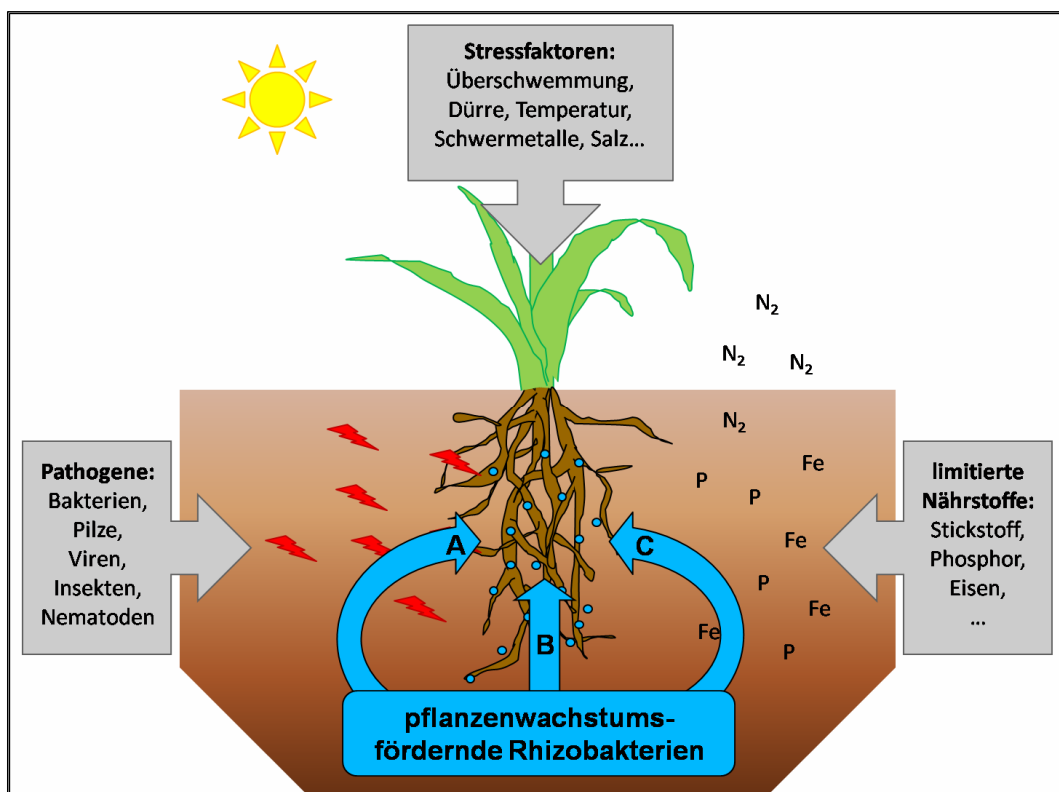


Abb. 2: Wirkmechanismen von pflanzenwachstums-fördernden Rhizobakterien

Schematisch dargestellt sind pflanzenwachstums-störende Einflüsse sowie die von wurzel-assoziierten Bakterien vermittelten Wege, das Pflanzenwachstum zu fördern.

Biokontrolle (A): Verminderung von Auswirkungen verschiedener Schädlinge (Blitze). **Phyto-stimulation (B):** Produktion stimulierender Substanzen und/oder Verminderung von Stress-Auswirkungen. **Biofertilisation (C):** Bereitstellung limitierender Nährstoffe (z.B. N, P, Fe).

1.2.1 Rhizosphäre und Rhizosphärenkompetenz

Der Begriff "Rhizosphäre" wurde erstmals vor über 100 Jahren von Lorenz Hiltner (1904) zur Beschreibung der "Einflusssphäre der Wurzel" genutzt. Gemeint war hiermit der Bodenbereich, in dem die Mikroflora von den Pflanzenwurzeln beeinflusst wird, was sich in einer Anhäufung der Mikroorganismen manifestiert ("Rhizosphäreneffekt"). Begünstigt wird diese im Schnitt etwa zehnfache Erhöhung der Zellzahl (im Vergleich zum umliegenden Boden) durch die Rhizodeposition, d.h. das Ausscheiden von Wurzelexsudaten (Lynch & Whipps 1990, Bais et al. 2006). Diese machen bis zu 40% der assimilierten Kohlenstoffverbindungen der Pflanzen aus und locken als leicht verfügbare Nährstoffquelle neben förderlichen auch schädigende Mikroorganismen an (Raaijmakers et al. 2009), wobei diese mikrobielle Gemeinschaft in der Rhizosphäre auch stark von Pflanzen- und Bodenart abhängt (Berg & Smalla 2009, Hartmann et al. 2009).

Als Rhizosphärenkompetenz wird die Fähigkeit von Bakterien beschrieben, sich nach der Beimpfung von Pflanzen erfolgreich im Wurzelbereich anzusiedeln und zu persistieren. Sie gilt als Voraussetzung für viele der von PGPR vermittelten positiven Effekte auf die Pflanzen (Weller 1988, Bloemberg & Lugtenberg 2001). Zu den Faktoren, die diese Kompetenz beeinflussen, zählen u.a. gerichtete Motilität, d.h. durch Wurzelexsudate ausgelöste Chemotaxis, erfolgreicher Wettbewerb um diese Exsudate, schnelles Wachstum sowie Toleranz gegenüber diversen chemischen und physikalischen Einflüssen des Bodens (Lugtenberg et al. 2001, Latour et al. 2003, Weller 2007).

1.2.2 Pflanzenwachstums-Förderung durch Biokontrolle

Pflanzen können von einer Vielzahl pathogener Organismen wie u.a. Bakterien, Pilzen, Viren und Insekten angegriffen und stark in Wuchs und Gesundheit beeinträchtigt werden, was Jahr für Jahr weltweit zu hohen Ernteaussfällen führt (Strange & Scott 2005). Negativen Einfluss können aber auch apathogene, lediglich wachstumshemmende Mikroorganismen (*deleterious rhizosphere microorganisms*, DRMO) ausüben (Schippers et al. 1987).

Als *biological control agents* (BCA) bezeichnete PGPR fördern das Wachstum bzw. die Gesundheit von Pflanzen, indem sie über verschiedenste, meist eher indirekte Wege die schädigenden Einflüsse von pathogenen oder hemmenden Organismen vermindern (Whipps & Gerhardson 2007). Diese Wege werden unter dem Begriff *biocontrol* oder "Biokontrolle" zusammengefasst.

1.2.2.1 Wettbewerb um Lebensraum und Nährstoffe

Ein als *competition for nutrients and niches* (CNN) bezeichneter Mechanismus der Bio-kontrolle umfasst die kompetitive Besiedlung der Rhizosphäre bzw. von bevorzugten Infektionsstellen an der Wurzel durch die PGPR. Damit verbunden ist auch die Limitierung von Nährstoffen wie z.B. Wurzelexsudaten durch effizientere Metabolisierung, wodurch insgesamt die Proliferation von schädigenden Mikroorganismen verhindert wird (Whipps 2001, Kamilova et al. 2005).

Auch die Limitierung des essentiellen Nährelements Eisen durch die Produktion von Siderophoren kann z.B. nachweislich das Wachstum von pathogenen Pilzen vermindern. Durch Abgabe dieser niedermolekularen Komplexbildner mit hoher Affinität zu Eisen(III)-Ionen werden diese im Milieu gebunden und zunächst in einer für viele andere Mikroorganismen nicht mehr verfügbaren Form fixiert (Kloepper et al. 1980a). Die Eisenkomplexe werden dann aktiv von den PGPR aufgenommen (Guirenot 1994), wobei manche Pseudomonaden beispielsweise hierbei auch die Siderophoren anderer Bakterien und sogar die von Pilzen aufnehmen und somit das Nährelement noch weiter limitieren können (Loper & Henkels 1999, Bodilis & Cornelis 2009).

1.2.2.2 Antibiose

Pflanzenwachstums-fördernde Rhizobakterien können über die Abgabe unterschiedlichster antimikrobieller Metabolite gegen schädliche Mikroorganismen in der Rhizosphäre wirken (Fernando et al. 2005), wobei die Wirkstoffe von antagonistischen, fluoreszierenden Pseudomonaden besonders intensiv untersucht wurden (u.a. Dwivedi & Johri 2003). Ein wichtiges Beispiel hierfür ist 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG oder Phl, siehe Abb. 3), das gegen eine Bandbreite von pflanzen-schädigenden Organismen wie Bakterien, Pilze und sogar Nematoden wirken kann (Keel et al. 1992, Weller et al. 2007). Gegen Nematoden agieren z.B. auch flüchtige Verbindungen, die vom Stamm *Bacillus megaterium* YFM3.25 abgegeben werden (Huang et al. 2010). Neben diesen einfachen Metaboliten können aber auch von den PGPR produzierte lytische Enzyme wie beispielsweise Chitinasen die Proliferation von pathogenen Pilzen vermindern und durch den Abbau von deren Zellwänden darüber hinaus Nährstoffe für die Rhizobakterien bereitstellen (Chernin & Chet 2002).

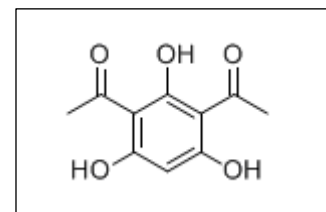


Abb. 3: 2,4-Diacetylphloroglucinol (DAPG)

1.2.2.3 Antagonismus gegenüber Pathogenitätsfaktoren

Die Degradation und Detoxifizierung von Virulenzfaktoren verschiedener Pflanzenpathogene stellt einen weiteren Weg der Biokontrolle dar. Der PGPR-Stamm *Pantoea dispersa* z.B. vermag das Phytotoxin Albicidin von *Xanthomonas albilineans* enzymatisch zu detoxifizieren und somit dessen Pathogenität zu vermindern (Zhang & Birch 1997).

Da die Expression vieler bakterieller Virulenz- und Pathogenitätsfaktoren über das zelldichte-abhängige System Quorum Sensing (QS) induziert wird (Bassler 1999, Veselova 2010), kann die von PGPR vermittelte Degradation der QS-Signalmoleküle (z.B. *N*-Acylhomoserinlactone, AHLs) die Ausprägung der schädigenden Phänotypen unterdrücken. Die Produktion der zellwand-abbauenden Enzyme des Pflanzenpathogens *Erwinia carotovora* etwa kann durch den Stamm *Bacillus* sp. 240B1 erfolgreich über diesen Weg inhibiert werden (Dong et al. 2000).

1.2.2.4 Induzierte systemische Resistenz

Viele Pflanzen starten als Antwort auf einen Pathogenbefall eine Reihe von Abwehrreaktionen, die für längere Zeit die Widerstandsfähigkeit gegen weiteren Befall erhöhen. Dieses Phänomen wird als systemisch erworbene Resistenz (*systemic acquired resistance*, SAR) bezeichnet (Durrant & Dong 2004).

Eine phänotypisch ähnliche Einleitung von Abwehrmechanismen, die aber anstelle von tatsächlichem Pathogenbefall durch PGPR veranlasst wird, wird als induzierte systemische Resistenz (*induced systemic resistance*, ISR) bezeichnet (van Loon et al. 1998). Eingeleitet wird die ISR durch verschiedene Faktoren wie beispielsweise Siderophoren, Antibiotika oder auch AHLs und wurde als wirksamer Schutz vor pathogenen Einflüssen bei zahlreichen Pflanzen bestätigt (van Loon 2007).

Zu den induzierten Abwehrreaktionen gehören u.a. die Verstärkung der pflanzlichen Zellwände, die erhöhten Aktivitäten von Enzymen wie Chitinasen oder auch die verstärkte Produktion von Phytoalexinen, d.h. von pflanzlichen Verbindungen mit antimikrobiellen Eigenschaften (Whipps & Gerhardson 2007).

1.2.3 Pflanzenwachstums-Förderung durch Nährstoffbereitstellung

Mehrere wichtige Nährstoffe wie Stickstoff (N) oder Phosphor (P) sind im Boden nicht oder nur in geringem Maße direkt verfügbar und wirken somit limitierend auf das Wachstum von Pflanzen ein. Als *biofertilizers* charakterisierte PGPR zeichnen sich dadurch aus, dass sie diese Nährelemente bereitstellen und dadurch das Pflanzenwachstum unterstützen können (Vessey 2003).

1.2.3.1 Stickstofffixierung

Verschiedene, als diazotroph bezeichnete Arten von Bakterien können den inerten Luftstickstoff in der chemischen Form Ammoniak (NH_3) fixieren und so das essentielle Nährelement für Pflanzen zur Verfügung stellen. Am bekanntesten und längsten erforscht sind die symbiotisch in Wurzelknöllchen von Leguminosen lebenden, als "Rhizobien" zusammengefassten Spezies von u.a. *Bradyrhizobium* und *Rhizobium* (Franche et al. 2009). Diese Rhizobien und verschiedene andere Bakterienarten können jedoch auch bei anderen Pflanzenarten die Versorgung mit dem Element verbessern: endophytisch in Nicht-Leguminosen wie z.B. Reis oder Mais lebende Bakterien wie Spezies von *Azospirillum*, *Burkholderia* oder auch *Rhizobium* können die Stickstoffversorgung und das Wachstum dieser Pflanzen positiv beeinflussen (Bhattacharjee et al. 2008).

Darüber hinaus können freilebende Rhizobakterien wie z.B. Vertreter der Gattungen *Azospirillum*, *Burkholderia* oder *Bacillus* Luftstickstoff fixieren (Ahmad et al. 2008), wobei der jährliche Beitrag dieser Bakterien zum fixierten Stickstoff im Boden auf bis zu 60 kg ha^{-1} geschätzt wird (Cleveland et al. 1999). Aufgrund des hohen energetischen Aufwands der Stickstofffixierung trägt diese bei freilebenden Bakterien wahrscheinlich jedoch weniger zur Förderung von Pflanzenwachstum bei und eventuelle positive Effekte sind oftmals eher von anderen Mechanismen verursacht (Dobbelaere et al. 2003, Saleh-Lakha & Glick 2007).

1.2.3.2 Phosphatsolubilisierung

Nach Stickstoff stellt Phosphor den zweitwichtigsten Nährstoff für das Wachstum von Pflanzen dar (Deubel & Merbach 2005). Zwar liegt das Nährelement in teilweise hohen Konzentrationen in Böden vor, der lösliche und somit für Pflanzen verfügbare Anteil ist jedoch weitaus geringer und liegt im mikromolaren Bereich und darunter (Bielecki 1973). Pflanzen nehmen Phosphor hauptsächlich in Form von primärem (H_2PO_4^-) und sekundärem Phosphat (HPO_4^{2-}) auf (Richardson et al. 2009). Da diese Verbindungen jedoch hoch reaktiv sind, kommt es je nach pH-Wert des Bodens zur Festlegung des Nährstoffs: im alkalischen

Bereich wird Phosphat von Calcium u.a. in Form von Apatiten fixiert, im sauren Milieu entstehen unlösliche Verbindungen mit Aluminium, Eisen und deren Oxiden und Hydroxiden (Lindsay 1979). Neben diesen anorganischen Verbindungen liegen auch organisch gebundene Phosphate, beispielsweise in Form von Nukleinsäuren oder dem Speicherstoff Phytat im Boden vor, die im Schnitt etwa 50% des gesamten Phosphat-Vorkommens ausmachen (Barber 1984).

Als sog. Phosphatsolubilisierung wird das Lösen und somit Bereitstellen von gebundenen Phosphaten aus dem Boden bezeichnet, was von einer Vielzahl von Bakterien bewirkt werden kann (Rodríguez & Fraga 1999). Die Solubilisierung von organisch gebundenem Phosphat erfolgt enzymatisch, wobei unspezifische Phosphatasen, Phytasen, Phosphonatasen und C-P-Lyasen wirken (Rodríguez et al. 2006). Die Lösung von anorganisch gebundenen Phosphaten geschieht durch Absenkung des pH-Werts über die Exkretion von Protonen und/oder durch Abgabe von organischen Säuren, die ebenfalls chelierende Eigenschaften haben können und durch Bildung von Komplexen mit den Metallionen das Phosphat freigegeben (Gyaneshwar et al. 2002). Es können hierfür verschiedene organische Säuren wie z.B. Zitronen-, Essig- oder Apfelsäure (Khan et al. 2007) von den Mikroorganismen produziert werden, wobei für einen Großteil der Gram-negativen Bakterien wie z.B. auch Pseudomonaden beschrieben ist, dass sie aus Glucose über die periplasmatischen Enzyme Glucosedehydrogenase und Gluconat-dehydrogenase die organischen Säuren Gluconsäure bzw. Ketogluconsäure bilden (Miller et al. 2010).

1.2.3.3 Bereitstellung anderer Nährstoffe

Auch andere wichtige Nährelemente können von PGPR für das Pflanzenwachstum verfügbar gemacht werden. Der Stamm *Bacillus edaphicus* NBT beispielsweise steigert durch Mobilisierung von Kalium aus dem Boden das Wachstum von Baumwolle (*Gossypium hirsutum*) und Raps (*Brassica napus*) (Sheng 2005).

Bakterien können zudem auch durch die Produktion von Siderophoren (vgl. Abschnitt 1.2.2.1) die Verfügbarkeit des wichtigen Nährelements Eisen für Pflanzen verbessern, wenn diese die bakteriellen Komplexbildner aufnehmen und somit die gebundenen Metall-Ionen akquirieren können (Podile & Kishore 2007).

1.2.4 Pflanzenwachstums-Förderung durch Phytostimulation

Manche pflanzenwachstums-fördernde Rhizobakterien können direkt auf den pflanzlichen Stoffwechsel einwirken und das Wachstum der Pflanzen so positiv beeinflussen. Bei dieser Wirkweise werden die PGPR auch als *phytostimulators* (Phytostimulatoren) bezeichnet (Lugtenberg et al. 2002).

1.2.4.1 Produktion von Phytohormonen

Die Entwicklung der Pflanze wird in ihren verschiedenen Stadien über eine Reihe von hormonellen Substanzen gesteuert (Weyers & Paterson 2001). Da diese Stoffe teilweise auch von Mikroorganismen synthetisiert werden können, vermögen eben diese bei Assoziation mit Pflanzen deren Wachstum direkt zu beeinflussen. Die hierbei von PGPR in der Regel induzierte Stimulation des Wurzelwachstums sorgt für besseren Halt im Boden und vergrößert die resorbierende Oberfläche, was die Aufnahme von Wasser und Nährstoffen verbessert und letztendlich auch die oberirdische Biomasse erhöht (Glick et al. 1999).

Die am längsten bekannte Gruppe der Phytohormone sind die Auxine, zu denen die als "Hetero-Auxin" bezeichnete Indol-3-Essigsäure (*indole-3-acetic acid*, IAA) gehört (siehe

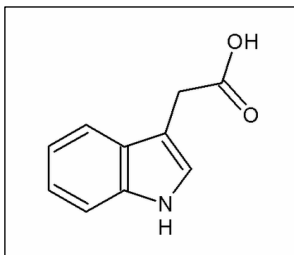


Abb. 4: Indol-3-Essigsäure (IAA)

Abb. 4). Diese wird hauptsächlich aus der Aminosäure Tryptophan gebildet, andere Synthesewege sind aber ebenfalls bekannt (Woodward & Bartel 2005). Die Wirkung von IAA ist konzentrationsabhängig, da geringe Konzentrationen des Phytohormons (10^{-9} bis 10^{-12} M) das Wachstum der Primärwurzel fördern, höhere Konzentrationen hingegen induzieren in der Pflanze die Synthese des Phytohormons Ethylen (vgl. Abschnitt

1.2.4.3), was wiederum eine Hemmung des Streckungswachstums bewirkt (Glick et al. 1999). Es wird angenommen, dass etwa 80% aller Rhizobakterien Auxine synthetisieren können, wobei hierunter sowohl wachstumsfördernde als auch pathogene bzw. schädliche Arten vertreten sind (Patten & Glick 2000).

Andere pflanzliche Hormone, deren Produktion von Rhizobakterien nachweislich einen förderlichen Effekt auf das Wachstum von Pflanzen ausübt, sind z.B. Cytokinine und Gibberilline (Vessey 2003).

1.2.4.2 Abgabe anderer wachstumsfördernder Verbindungen

Eine weitere Art der Phytostimulation durch pflanzenwachstums-fördernde Rhizobakterien ist die Produktion diverser flüchtiger organischer Verbindungen (*volatile organic compounds*, VOCs). Das vom Stamm *Bacillus subtilis* GB03 abgegebene 2,3-Butandiol löst beispielsweise bei der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) die induzierte systemische Resistenz (ISR) aus (siehe Abschnitt 1.2.2.4). Dieselbe Substanz fördert jedoch außerdem *in vitro* signifikant das Wachstum der Pflanzen (Ryu et al. 2003).

Neben den VOCs können aber auch andere Substanzen Einfluss auf die Entwicklung von Pflanzen nehmen. Die Förderung des Wachstums von Tomate (*Solanum lycopersicum*) und Gurke (*Cucumis sativus*) durch den Stamm *Pseudomonas fluorescens* B16 konnte auf die Abgabe von Pyrrolochinolinchinon (PQQ) zurückgeführt werden, wobei der positive Effekt wahrscheinlich auf der antioxidativen Wirkung der Verbindung beruht (Choi et al. 2008).

1.2.4.3 Minderung des Stress-Ethylens

Ein anderer direkter Mechanismus der bakteriellen Förderung von Pflanzenwachstum ist die Reduktion von "Stress-Ethylen" (Glick et al. 2007). Zwar stellt das gasförmige Phytohormon Ethylen einen wichtigen Regulator diverser Prozesse der Pflanzenentwicklung dar (Bleecker & Kende 2000), die durch Stress induzierte übermäßige Produktion des Gases führt jedoch zur Inhibition des pflanzlichen Wachstums bis hin zur frühzeitigen Seneszenz (Morgan & Drew 1997). Die auslösenden Stressfaktoren können unterschiedlicher Natur sein: Trockenheit, Überflutung, Pathogenbefall, Verletzung, ungünstige Temperaturen, aber auch zu hohe Gehalte von Salz oder Schwermetallen wie z.B. Kupfer können die Bildung von Stress-Ethylen induzieren, die in der Pflanze durch enzymatische Oxidation des direkten Vorläufermoleküls 1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure (ACC) abläuft (Abeles et al. 1992).

PGPR mit dem Enzym ACC Deaminase (EC 3.5.99.7) können diese Ethylen-Vorstufe durch irreversible Spaltung in Ammoniak und α -Ketobutyrat abbauen (Honma & Shimomura 1978). Dies bietet den Bakterien zum einen mit den Spaltprodukten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen zur Proliferation, und zum anderen wird die Synthese des Stresshormons in der Pflanze vermindert, was sich durch deren verbessertes Wachstum unter den Stressbedingungen manifestiert (Glick et al. 2007). Es wird angenommen, dass die PGPR sich hierfür an den Samen oder Keimlingswurzeln anlagern und über die Abgabe von Indol-3-Essigsäure die Synthese von ACC in der Pflanze anregen. Diese Verbindung exsudiert über die Wurzel ins umgebende Milieu und wird dort dann direkt von den Bakterien abgebaut (Glick et al. 1998).

1.2.5 Nutzung von pflanzenwachstums-fördernden Rhizobakterien

Angesichts der stetig zunehmenden Weltbevölkerung entsteht ein immer höherer Bedarf an Nahrungsmitteln. Um diesem Bedarf gerecht zu werden, steigen auch die Mengen an eingesetzten Mineraldüngern und chemischen Schädlingsbekämpfungsmitteln, die aber neben der Ertragssteigerung auch unerwünschte Nebeneffekte zeigen. Die Anhäufung von Phosphat im Boden beispielsweise kann bei Ausschwemmung zur Eutrophierung von Gewässern führen (Torrent et al. 2007), und von den großen Mengen an ausgebrachten Pestiziden gelangt nur ein Bruchteil wirklich zu den Pathogenen, was den Boden und auch das Grundwasser mit den xenobiotischen Verbindungen belastet (Pimentel 1995).

Als eine nachhaltigere Alternative zu chemischen Schädlingsbekämpfungsmitteln und Düngern bieten sich Mikroorganismen an, die als "natürliche" Präparate kaum eine Belastung für die Umwelt darstellen und zudem in der Biokontrolle durch ihre meist multiplen Wirkmechanismen die Gefahr der Resistenzbildungen bei Schädlingen vermindern (Berg 2009). Die Applikation von PGPR kann neben den Erträgen auch Faktoren wie u.a. Keimungsrate, Blattgröße und die Gehalte an Chlorophyll, Protein und Nährstoffen wie Magnesium und Stickstoff erhöhen (Lucy et al. 2004). Ebenfalls lässt sich z.B. zur Verminderung der bereits erwähnten Eutrophierung nachweislich durch Zugabe von PGPR-Präparaten die Menge an benötigten Düngern verringern (Adesemoye & Kloepper 2009). Das Interesse an der Applikation von wachstumsfördernden Bakterien für die Forstwirtschaft hat auch in den letzten zwei Jahrzehnten zugenommen (Lucy et al. 2004), und zukünftig könnten mithilfe von salz-toleranten Bakterien vielleicht aride und versalzte Landstriche für die Landwirtschaft nutzbar gemacht werden (Egamberdiyeva & Islam 2008).

1.2.5.1 Nutzung in der Landwirtschaft

Der förderliche Einfluss, den symbiotisch innerhalb von Wurzelknöllchen lebende Rhizobien durch Fixierung von Stickstoff auf das Wachstum von Leguminosen ausüben, ist bereits seit weit über 100 Jahren bekannt und wurde schon lange Zeit vorher, wenn auch unbewusst, zur Steigerung von Erträgen eingesetzt (Vessey 2003). Aber auch andere Arten von Bakterien wie etwa Vertreter der Spezies *Bacillus megaterium* wurden z.B. in den 1950ern in der ehemaligen Sowjetunion großflächig zur Verbesserung des Wachstums verschiedener Nutzpflanzen eingesetzt (Brown 1974). In China findet ebenfalls seit Ende der 1970er intensive Forschung an PGPR statt (bzw. an *yield increasing bacteria* oder YIB, wie die Bakterien aufgrund der weitaus geringeren Anzahl von benötigten Schriftzeichen dort genannt werden), und große Mengen von Präparaten auf *Bacillus*-Basis wurden Ende der 1980er vor

Ort genutzt (Kloepper 1994). Castro-Sowinski et al. (2007) geben eine aktuellere Literaturübersicht und stellen z.B. für Argentinien, Brasilien, Bolivien und Uruguay dar, dass im Zeitraum 2006/2007 fast 25 Mio. ha der mit Sojabohnen (*Glycine max*) bebauten Flächen mit der stickstofffixierenden Spezies *Bradyrhizobium japonicum* inokuliert wurden.

Lucy et al. (2004), Ehlers (2006) und Berg (2009) legen Übersichten über die große Zahl an käuflichen *biofertilizer*- und BCA-Präparaten basierend auf Spezies von u.a. *Azospirillum*, *Bacillus* und *Pseudomonas* vor. Berg (2009) gibt zudem an, dass sich 2004 der Markt für Biokontroll-Produkte allein in der Europäischen Union auf etwa 120 Mio. Dollar belaufen hat und zukünftig mit einer Wachstumsrate von 5% zu rechnen sei.

1.2.5.2 Nutzung für ökologische Aspekte

Neben der bereits zum Teil etablierten landwirtschaftlichen Anwendung von PGPR rücken auch immer mehr ökologische Aspekte in den Fokus der Forschung und Entwicklung (Bashan et al. 2008), wobei ein wichtiges Gebiet die bakterielle Unterstützung von Phytoremediation ist (Vamerali et al. 2010). Hierunter versteht man die Nutzung von Pflanzen zur Sanierung von belasteten Böden und Gewässern, indem z.B. von den Pflanzen verschiedene schädliche Verbindungen abgebaut (Phytotransformation) oder auch Schwermetalle aus dem Boden aufgenommen werden (Phytoextraktion), was dann bei Ernte der Biomasse die Entsorgung oder auch Aufbereitung der akkumulierten Metalle ermöglicht.

Der Einsatz von pflanzenwachstums-fördernden Rhizobakterien kann hierbei u.a. durch ACC Deaminase-Aktivität das Pflanzenwachstum auf den belasteten Böden verbessern und somit bewirken, dass die Pflanzen z.B. Metalle verstärkt aufnehmen und akkumulieren können (Arshad et al. 2007). Lucy et al. (2004) und Khan et al. (2009) legen zusammenfassende Darstellungen verschiedener Bakterienstämme vor, die bei unterschiedlichen Pflanzen die Phytoremediation von Schadstoffen wie Schwermetallen oder auch polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen verbessert haben. Ein anderer potentieller Ansatz in diesem Rahmen ist die Nutzung von Auxin-produzierenden *Azospirillum*-Stämmen, die zur Wachstumsförderung von Mikroalgen beitragen und dadurch deren Vermögen zur Aufnahme von Phosphaten und Ammoniak aus Abwässern verbessern können (Bashan et al. 2008).

Eine weitere Anwendung, die sog. Phytostabilisation, dient der Festlegung von Schadstoffen, damit diese nicht in die Umwelt verbreitet werden, und kann auch von Bakterien unterstützt werden. Abraumhalden in trockenen Gebieten wie dem Westen der USA oder Nordmexiko beispielsweise sollen in Zukunft mithilfe von PGPR-behandelten Pflanzen erfolgreicher abgedeckt werden, um Verwehungen des schwermetallhaltigen Abraums und Belastung der

umliegenden Regionen zu vermindern (Grandlic et al. 2008). Ebenso werden Versuche unternommen, das Kakteen-Wachstum in ariden Regionen Mexikos bakteriell zu unterstützen, um durch vermehrte Wurzelentwicklung die Verwehung von staubigem Sand und davon resultierende chronische Atemwegserkrankungen zu vermeiden (Bashan et al. 2008).

1.2.5.3 Isolierung und Formulierung von PGPR

Da in der Rhizosphäre eine Vielfalt an Bakterien (schädigende, neutrale und förderliche) zu finden ist (Hartmann et al. 2009), gestaltet sich die Isolierung von PGPR zum Teil relativ unproblematisch und hängt lediglich von den Ansprüchen der Bakterien ab, was Nährstoffe und Kultivierungsbedingungen angeht (Bashan et al. 1993). Die pflanzenwachstumsfördernden Eigenschaften der isolierten Mikroorganismen lassen sich dann zunächst *in vitro* über verschiedene Tests aufzeigen, wobei sich die Phosphatsolubilisierung etwa in speziellen Nährmedien wie NBRIP (Nautiyal 1999) nachweisen lässt. Antagonistische Eigenschaften z.B. gegenüber bestimmten phytopathogenen Pilzen werden in der Regel zunächst in einem Agar-Assay getestet (Bashan et al. 1993). Hierfür werden PGPR-Stamm und Pilz zusammen auf einer Agar-Platte bebrütet und das eventuell behinderte Wachstum des Pilzes gibt Auskunft über die Biokontroll-Kapazitäten des Bakteriums. Zusätzlich bieten sich auch molekular-biologische Tests an, um die Gene z.B. zur Produktion von Antibiotika wie DAPG nachzuweisen (Velusamy & Gnanamanickam 2003). Potentielle PGPR werden dann in der Regel *in vivo* darauf getestet, ob sie die im Labor nachgewiesenen Eigenschaften auch zur Förderung des Pflanzenwachstums im Gewächshaus oder auch im Feld manifestieren. Bei wiederholt nachgewiesenen positiven Effekten auf die Pflanzen kann dann erwogen werden, die Bakterien *in situ* einzusetzen oder gar zu vermarkten.

Ein entscheidender Faktor zur erfolgreichen Applikation von pflanzenwachstumsfördernden Rhizobakterien ist jedoch die Formulierung, d.h. die Immobilisierung der Bakterien in einem Trägermedium, wobei gleichzeitiges Ziel auch eine möglichst lange Haltbarkeit ohne Zellzahlverluste ist (Nakkeeran et al. 2005). Gerade als Produkt zur landwirtschaftlichen Nutzung muss die Formulierung zudem für jeden potentiellen Anwender, also auch z.B. für Kleinbauern in Entwicklungsländern unkompliziert und ohne hohen technischen Aufwand anwendbar und vor allem bezahlbar sein, um überhaupt als attraktive Alternative zu den konventionellen Produkten fungieren zu können (Bashan 1998).

Die Formulierung ist stark von den jeweiligen Mikroorganismen abhängig: der Genus *Bacillus* gilt z.B. als vielversprechender Kandidat für PGPR-Produkte, da durch die Bildung von widerstandsfähigen Endosporen bei dieser Gattung die Herstellung und insbesondere die

Lagerung der Produkte deutlich erleichtert wird (Backman et al. 1997). Die in der Forschung oftmals durchgeführte Beimpfung (Inokulation) von Pflanzensamen und Keimlingswurzeln durch Eintauchen in eine frische Bakteriensuspension (direkt vom Schüttelinkubator oder aus dem Fermenter) ist nicht unproblematisch für jedermann durchführbar, vor allem nicht in größeren Dimensionen. Aus diesem Grund ist in der Regel die Immobilisierung der Zellen auf oder in einem geeigneten Trägermaterial notwendig (Nakkeeran et al. 2005). Die Autoren geben eine Literaturübersicht zu verschiedenen Ansätzen und deren Trägermaterialien (wie z.B. Talkum-Pulver, Torf, Vermiculit), den immobilisierten Mikroorganismen (hauptsächlich *Bacillus* sp. und *Pseudomonas* sp.) sowie die Haltbarkeit der Präparate (bis zu zwölf Monate). Dieser letzte Aspekt wird u.a. auch von der Partikelgröße beeinflusst: mit abnehmender Größe der Partikel steigt auch die Überlebensrate bzw. -zeit der assoziierten Bakterienzellen (Dandurand et al. 1994).

Eine weitere Art von Formulierung stellt die Immobilisierung in Alginat dar (Bashan 1986a). Eine Lösung dieses Polysaccharids aus Braunalgen polymerisiert bei Kontakt mit Calcium-Ionen sofort, was bei Eintropfen einer Alginat/Bakterien-Suspension in eine Calcium-Lösung die Möglichkeit zur Herstellung von kleinen viskosen Kugeln mit eingebetteten Bakterienzellen bietet. Die Größe der Kugeln kann je nach Aufwand der Herstellung verringert werden, und auch eine Gefriertrocknung ist möglich (Bashan et al. 2002). Der Vorteil von Alginat-Kugeln liegt darin, dass sie zusammen mit Samen und/oder Dünger ausgebracht werden können, wobei die Zellen innerhalb der Kugeln zunächst geschützt sind und im Laufe der Zeit stetig aus dem sich langsam abbauenden Alginat entlassen werden. Darüber hinaus können die Kugeln nach der Herstellung unter Kühlung über Jahre ohne hohe Qualitäts- bzw. Zellzahlverluste gelagert werden, obwohl hierbei teilweise das Alginat von den Mikroorganismen bzw. deren Metaboliten angegriffen und somit die Lagerzeit verkürzt werden kann (Trivedi & Pandey 2008).

Für die erfolgreiche wirtschaftliche Vermarktung von PGPR-Produkten spielen noch weitere Faktoren eine Rolle (Fravel 2005, Nakkeeran et al. 2005), wie unter anderem auch die behördliche Registrierung mit Beurteilung der eventuellen Pathogenität des Produktes (Zachow et al. 2009). Bashan (1998) zufolge stehen aber zunächst nach der Isolierung geeigneter Stämme zahlreiche Tests an, um eine geeignete Formulierung für die Zellen zu finden und den Schritt vom Labor auf den Markt zu ermöglichen.

1.3 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Suche nach Möglichkeiten, die Rekultivierungsmaßnahmen der Kalirückstandshalde Sigmundshall durch mikrobiologische Ansätze zu unterstützen. Dadurch soll ein Beitrag zur weiteren Reduzierung des jährlich anfallenden, niederschlagsbedingten Haldenwassers geleistet werden.

Zunächst standen die Isolierung und Charakterisierung von Rhizobakterienstämmen mit pflanzenwachstums-fördernden Eigenschaften im Vordergrund. Hinsichtlich der Düngeproblematik bei den Begrünungsmaßnahmen lag das besondere Augenmerk bei Bakterien, die gebundene Phosphate aus dem Boden lösen und den Pflanzen zur Verfügung stellen könnten. Darüber hinaus sollten die Bakterien (a) Toleranz gegenüber dem Abdecksubstrat REKAL/SAV, (b) eine Rhizosphärenkompetenz, sowie (c) möglichst auch weitere wachstums-förderliche Eigenschaften mit sich bringen, die bei der Begrünung des extremen Standorts von Nutzen sein könnten. Neben der Produktion von Phytohormonen und Siderophoren war ein weiteres wichtiges Kriterium in diesem Kontext das bakterielle Enzym ACC Deaminase, das die Auswirkungen des vom Abdecksubstrat induzierten Stresses auf die Pflanzen verringern könnte.

In Gewächshausversuchen wurden die potentiellen PGPR-Stämme dann darauf getestet, ob sie das Wachstum des zur Erstbegrünung genutzten Deutschen Weidelgrases (*Lolium perenne*) auf REKAL/SAV als Anzuchtsubstrat fördern können. Im Rahmen dieser Versuche sollten zudem verschiedene Arten der Formulierung etabliert und miteinander verglichen werden, um eine geeignete Form der Applikation der PGPR-Stämme in den Rekultivierungsmaßnahmen zu finden.

Rhizosphärenisolate, die sich *in vivo* wiederholt als pflanzenwachstums-fördernd herausgestellt hatten, wurden daraufhin weiter untersucht. Das Ziel hierbei war auch, sie möglichst genau zu identifizieren. Zur Untersuchung wurden verschiedene physiologische, biochemische, bodenbiologische und molekularbiologische Methoden genutzt, deren Ergebnisse auch als Grundlage phylogenetischer Analysen dienten. Zudem sollten u.a. über gentechnische Arbeiten Einblicke in den genauen Wirkmechanismus der Wachstumsförderung gewonnen werden.

2. Material & Methoden

2.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Die Bezeichnungen spezieller Geräte wie z.B. Rasterelektronenmikroskop oder Elektroporator sind in den jeweiligen Methodenbeschreibungen vermerkt, alle anderen genutzten Apparaturen und Verbrauchsmaterialien sind nachfolgend aufgeführt.

Autoklaven:

Zirbus Matachana HST 250	Zirbus GmbH, Bad Grund
Zirbus Dampfsterilisator HST 4-5-6	Zirbus GmbH, Bad Grund

Geldokumentationsanlage:

INTAS Geldokumentationssystem	INTAS, Göttingen
-------------------------------	------------------

Gelelektrophoreseapparaturen:

RTF Trennstelltrafo LTS 002	VEB, Thalheim
Horizontal-Gelkammer FU340	biostep GmbH, Jahnsdorf
SDS-Gelsystem Mini PROTEAN 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, München
Power Supply PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories, München

Inkubationsschränke:

Memmert Modell 500	Memmert GmbH, Schwabach
--------------------	-------------------------

Inkubationsschüttler:

Kreisschüttler TR-125	Infors AG, Schweiz
-----------------------	--------------------

pH-Meter:

WTW Microprocessor pH Meter pH 537	WTW, Weilheim
------------------------------------	---------------

Photometer:

Spectrophotometer UVIKON 930	Kontron Instruments, Eching
------------------------------	-----------------------------

Pipetten:

Dosierpipette Gilson Distriman S10543D	Abimed, Langenfeld
Kolbenhubpipetten	Abimed, Langenfeld

Sterile Werkbank:

Mikrobiologische Sicherheitskabine ASW-UP IV-1906	Bleymehl Reinraumtechnik, Inden
---	---------------------------------

Thermocycler:

Primus 25	MWG-Biotech, Ebersberg
Primus 96 plus	MWG-Biotech, Ebersberg

Waagen:

Sartorius Basic BA BB 200

Sartorius AG, Göttingen

Sartorius Basic BA 110 S

Sartorius AG, Göttingen

Zentrifugen:

Tischzentrifuge 1-15

Sigma, Osterode

Untertisch-Zentrifuge GPK Centrifuge

Beckmann Coulter, USA

Verbrauchsmaterialien wie Pipettenspitzen (mit und ohne Filtereinsatz), Petrischalen, DNase-freie PCR-Reagiergefäße (200 µl), Reagiergefäße (1,5 ml, 2,0 ml), Schraubdeckelröhrchen (15 ml, 50 ml), Einwegspritzen (5 ml, 10 ml, 20 ml, 50 ml), Kanülen, Sterilfilter (Porengröße 0,2 µm) und Mikrotiter-Platten (96well) wurden von der Firma Sarstedt, Nümbrecht erworben.

2.2 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden generell in der Qualität "zur Analyse" von der Firma Merck KGaA, Darmstadt bezogen. Ausnahmen sind unten aufgeführt.

1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure

Acros Organics, Belgien

Agar-Agar

AppliChem GmbH, Darmstadt

Agarose

Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

L-Ascorbinsäure

Fisher Scientific GmbH, Schwerte

Cycloheximid

AppliChem GmbH, Darmstadt

EDTA Dinatrium Dihydrat

AppliChem GmbH, Darmstadt

Ethanol

Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

Ethidiumbromid

Sigma, Deisenhofen

Gentamycinsulfat

AppliChem GmbH, Darmstadt

Kanamycinsulfat

AppliChem GmbH, Darmstadt

Nystatin Dihydrat

Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe

Rifampicin

AppliChem GmbH, Darmstadt

Streptomycinsulfat

Sigma, Deisenhofen

Tricalciumphosphat

Fluka GmbH, Neu-Ulm

L-Tryptophan

Acros Organics, Belgien

2.3 Lösungen

Die in der Arbeit verwendeten Lösungen sind in der Regel in A. bidest angesetzt und bei Bedarf durch Sterilfiltrieren oder Autoklavieren für 20 min bei 121°C sterilisiert. Ausnahmen oder Besonderheiten sind hier aufgeführt.

1-Aminocyclopropan-1-carboxylsäure-Stammlösung, ACC (0,5 M)

In 2 ml A. bidest werden 101,1 mg ACC gelöst, die Lösung sterilfiltriert und Aliquots von 200 µl bei -20°C gelagert.

Ascorbinsäure-Lösung, nach DIN EN 1189 : 1996

In 100 ml A. bidest werden 10 g Ascorbinsäure gelöst. Die Lösung ist in einer licht-undurchlässigen Glasflasche bei 4°C zwei Wochen haltbar.

Coomassie-Färbelösung

In 800 ml A. bidest werden 23,5 ml Phosphorsäure (85%) und 50 g Aluminiumsulfat Octadecahydrat gelöst und langsam 20 ml einer 5%igen Lösung von Coomassie Brilliant Blue R250 in A. bidest hinzuge tropft. Abschließend wird mit A. bidest auf 1 L aufgefüllt.

Glucose-Stammlösung, (40%)

Von der Glucose werden 20 g abgewogen und unter Erwärmen in etwa 45 ml A. bidest gelöst. Dann wird auf 50 ml aufgefüllt, sterilfiltriert und die Lösung bei -20°C gelagert.

Kaliumphosphatpuffer, (0,25 M; pH 6,8)

Von einer Dikaliumhydrogenphosphat-Lösung (1 M) werden 124,25 ml mit 125,75 ml einer Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (1 M) vermischt, auf 1 L mit A. bidest aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

Orthophosphat-Stammlösung, (50 mg L⁻¹), nach DIN EN 1189 : 1996

Bei 105°C werden wenige Gramm Kaliumdihydrogenphosphat bis zur Massenkonstanz getrocknet und 0,2197 g davon in etwa 800 ml A. bidest aufgelöst. Nach Zugabe von 10 ml Schwefelsäure (4,5 M) wird mit A. bidest auf 1 L aufgefüllt. Die Stammlösung ist gut verschlossen in einer Glasflasche und bei Kühlung mindestens drei Monate haltbar.

Orthophosphat-Standardlösung, (2 mg L⁻¹), nach DIN EN 1189 : 1996

20 ml der Orthophosphat-Stammlösung werden mit A. bidest auf 500 ml aufgefüllt und danach gut vermischt. Die Lösung sollte am Tag des Gebrauchs angesetzt werden.

PBS-Puffer, (pH 7,4), nach Sambrook & Russel (2001)

In 800 ml A. bidest werden 8,0 g Natriumchlorid, 0,2 g Kaliumchlorid, 1,44 g Dinatriumhydrogenphosphat und 0,24 g Kaliumdihydrogenphosphat gelöst und der pH-Wert auf 7,4 eingestellt. Dann wird auf 1 L aufgefüllt und anschließend autoklaviert.

Salkowski-Reagenz, nach Pilet & Chollet (1970)

In 50 ml Schwefelsäure (7,9 M) wird 1 g Eisen(III)-chlorid Hexahydrat gelöst und die Lösung in einer lichtgeschützten Flasche gelagert.

Saure Molybdat-Lösung I, nach DIN EN 1189 : 1996

Eine Molybdat-Lösung (13,0 g Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat in 100 ml A. bidest) wird unter Rühren zu 300 ml Schwefelsäure (9 M) zugesetzt, danach wird eine Tartrat-Lösung (0,35 g Kaliumantimon(III)oxidtartrat-Hemihydrat in 100 ml A. bidest) zugegeben und gut gemischt. Die fertige Lösung ist in einer braunen Glasflasche mindestens zwei Monate haltbar.

Soerensen-Puffer, (pH 7,2)

Von einer Kaliumdihydrogenphosphat-Lösung (1 M) werden 27,4 ml zusammen mit 72,6 ml einer Dinatriumhydrogenphosphat-Lösung (1 M) auf insgesamt 1 L mit A. bidest aufgefüllt und die Lösung im Anschluss autoklaviert.

TAE-Puffer (50x)

In 600 ml A. bidest werden 242,0 g Tris-Base, 57,1 ml Eisessig und 100 ml einer EDTA-Lösung (0,5 M mit einem pH-Wert von 8,0) gelöst und mit A. bidest auf 1 L aufgefüllt.

Tryptophan-Stammlösung, (50 mM)

In 500 µl NaOH (1 M) werden 51,1 mg L-Tryptophan gelöst und mit A. bidest auf 5 ml aufgefüllt. Diese Lösung wird dann sterilfiltriert und sofort gebraucht.

2.4 Nährmedien

Aufgelistet sind die Zusammensetzungen speziellerer Medien, die bei Bedarf durch Zusatz von 15 g L^{-1} Agar-Agar auch als Festmedium dienen. Die Fertigmedien der Typen Müller-Hinton (MH), Pseudomonas F (PF) und Standard-I-Nährmedium (NI) der Firma Merck KGaA, Darmstadt wurden nach Herstellerangaben angesetzt.

Die Sterilisation aller Nährmedien erfolgte durch Autoklavieren bei 121°C für 20 min, und nach dem Abkühlen auf etwa 50°C wurden hitzeempfindliche, vorher sterilfiltrierte Bestandteile wie Antibiotika oder Kohlenstoff-Quellen steril hinzugefügt.

CAS-Agar, nach Schwyn & Neilands (1987)

Lösung 1 (Indikator-Lösung):

- CAS-Lösung
 - CAS (Chromazurol S) 60,5 mg
 - Wasser 50 ml
- Eisen-(III)-Lösung
 - $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$ 1 mM
 - HCl 10 mM
- HDTMA-Lösung
 - HDTMA 72,9 mg
 - Wasser 40 ml

Die CAS-Lösung wird mit 10 ml der Eisen-(III)-Lösung vermischt und dieses Gemisch danach unter Rühren langsam in die HDTMA-Lösung geben. Die dunkelblaue Flüssigkeit wird dann autoklaviert.

Lösung 2 (Grundlösung):

- KH_2PO_4 0,3 g
- NaCl 0,5 g
- NH_4Cl 1 g
- A. bidest 845 ml
- PIPES 30,24 g
- NaOH (50% w/w) 12 g
- Agar-Agar 15 g

Nach dem Autoklavieren des Gemischs wird folgendes steril hinzugegeben:

- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2 mM
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM
- Caseinhydrolysat (10%) 30 ml
- Glucose (40%) 25 ml

Als letztes wird die autoklavierte Lösung 1 langsam entlang des Glases hinzugegeben (mit genügend Bewegungsmoment zum Mischen, aber vorsichtig genug um Schaumbildung zu vermeiden).

LB-Medium, nach Miller (1972)

- Hefeextrakt 5 g
- Pepton aus Casein 10 g
- NaCl 10 g
- A. bidest ad. 1000 ml

M9-Minimalmedium, nach Sambrock & Russel (2001)

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 7,5 g
- KH_2PO_4 3 g
- NaCl 0,5 g
- NH_4Cl 1 g
- A. bidest ad. 973 ml

Nach dem Autoklavieren wird folgendes steril hinzugegeben:

- Glucose (40%) 25 ml
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 2 mM
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,1 mM

Als Abwandlungen des Mediums wurde teilweise auf den Zusatz des Ammoniumchlorids als Stickstoffquelle verzichtet (M9-N), diese aber in einer anderen Variante durch die Zugabe von 3 mM ACC ersetzt (M9+ACC).

National Botanical Research Institute's Phosphate Growth Medium (NBRIP), nach Nautiyal (1999), teilweise in Anlehnung an Gyaneshwar et al. (1998) abgewandelt

- $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 5 g
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 5 g
- KCl 0,2 g
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,1 g
- A. bidest ad. 975 ml

Mit HCl wird der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Bei Zugabe von 50 bzw. 100 mM Tris zum Medium wird der pH auf 8,0 justiert und das Medium als NBRIP50 bzw. NBRIP100 bezeichnet. Nach dem Autoklavieren wird bei allen Varianten folgendes steril hinzugegeben:

- Glucose (40%) 25 ml
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1 M) 0,25 g

SOC-Medium

- Trypton 20 g
- Hefeextrakt 5 g
- NaCl 0,5 g
- KCl 0,186 g
- MgCl_2 0,952 g
- A. bidest ad. 990 ml

Nach dem Autoklavieren wird folgendes steril hinzugegeben:

- Glucose (40%) 10 ml

TYG-Medium

- Trypton 5 g
- Hefeextrakt 5 g
- A. bidest ad. 987,5 ml

Nach dem Autoklavieren wird folgendes steril hinzugegeben:

- Glucose (40%) 12,5 ml

2.5 Bakterienstämme und antimikrobielle Agenzien

Die im Laufe der Arbeit isolierten Rhizobakterien, deren Mutanten, sowie die anderen genutzten Bakterienstämme (siehe Tab. 2) wurden alle in Standard-I-Nährmedium oder LB-Medium mit jeweils 50% Glycerin bei -20°C gelagert.

Tab. 2: Auswahl der genutzten bzw. untersuchten Bakterienstämme

Bezeichnung	Beschreibung	Referenz
<i>Escherichia coli</i>		
cc118 λ pir (pSM1890)	Donor-Stamm für Triparentales Mating, <i>gfp</i> , Sm ^r , Gm ^r	Haagensen et al., 2002
HB101 (RK600)	Helfer-Stamm für Triparentales Mating, Cm ^r	Kessler et al. 1992
Isolat		
1.8	Rhizosphärenisolat, Wildtyp	diese Arbeit
2.2	Rhizosphärenisolat, Wildtyp	diese Arbeit
2.2 Rif ^r	spontan Rif-resistenter Stamm 2.2	diese Arbeit
2.2 Rif ^r Sm ^r	spontan Rif- und Sm-resistenter Stamm 2.2	diese Arbeit
2.2 (pSM1890)	GFP-markierter Stamm 2.2 Rif ^r , Gm ^r , Sm ^r	diese Arbeit
2.2.Tn5.A	Transposon-Mutante des Stamms 2.2, Km ^r	diese Arbeit
2.2.Tn5.B	Transposon-Mutante des Stamms 2.2, Km ^r	diese Arbeit
2.2.Tn5.C	Transposon-Mutante des Stamms 2.2, Km ^r	diese Arbeit
2.2.Tn5.D	Transposon-Mutante des Stamms 2.2, Km ^r	diese Arbeit
2.5	Rhizosphärenisolat, Wildtyp	diese Arbeit
2.8	Rhizosphärenisolat, Wildtyp	diese Arbeit

Die Stammlösungen der genutzten Antibiotika und Antimykotika (siehe Tab. 3) wurden im jeweiligen Lösungsmittel angesetzt und ggf. sterilfiltriert (außer in Ethanol). Dann wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert.

Tab. 3: Genutzte antimikrobielle Agenzien

Bezeichnung	Stammlösung	Arbeitskonzentration
Chloramphenicol (Cm)	30 mg ml ⁻¹ in Ethanol	20 µg ml ⁻¹
Cycloheximid	10 mg ml ⁻¹ in A. bidest	50 µg ml ⁻¹
Gentamycin (Gm)	10 mg ml ⁻¹ in A. bidest	10 µg ml ⁻¹
Kanamycin (Km)	20 mg ml ⁻¹ in A. bidest	50 µg ml ⁻¹
Nystatin	20 mg ml ⁻¹ in DMSO	50 µg ml ⁻¹
Rifampicin (Rif)	20 mg ml ⁻¹ in Methanol	50 µg ml ⁻¹
Streptomycin (Sm)	50 mg ml ⁻¹ in A. bidest	50 µg ml ⁻¹

2.6 Material für Pflanzenversuche

Allgemeine Angaben zu den genutzten Pflanzen und Substraten sind im Folgenden aufgeführt. Die Einzelheiten zu den Pflanzenexperimenten sind den jeweiligen Versuchsbeschreibungen zu entnehmen.

Für alle hier durchgeführten Pflanzenversuche wurde das Deutsche Weidelgras (*Lolium perenne* L. cv. Juwel) als Testpflanze genutzt, da es auch bei den Begrünungsmaßnahmen der abgedeckten Salzhalden als Pionier- und Ammenpflanze genutzt wird (Niessing 2005).

Angezogen wurden die Testpflanzen in der Regel auf entsalztem Abdecksubstrat (REKAL/SAV), das direkt von der Rückstandshalde Sigmundshall gewonnen wurde. Dazu wurden von neu abgedeckten und bereits intensiv bewässerten Abschnitten der Halde die oberen etwa 10 cm der Abdeckschicht entnommen (in denen die phytotoxischen Salzkonzentrationen bereits weitestgehend verringert wurden) und zunächst in Gummiwannen gesammelt. Vor dem Befüllen der Pflanzgefäße wurde dann das gesamte Substrat aus allen Wannen vereint und manuell homogenisiert.

Der genutzte Ackerboden stammte aus Hebenshausen (Hessen) und der ebenfalls eingesetzte gesiebte Biokompost (< 20 mm) aus Witzenhausen (Hessen).

Die Parameter pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Trockensubstanzanteil sowie die Gehalte an Stickstoff, Phosphor, Kalium, Magnesium und Chlor der eingesetzten Substrate wurden wie bei Scheer (2001) und Niessing (2005) beschrieben analysiert und sind in den Ergebnisbeschreibungen der einzelnen Gewächshausversuche aufgeführt.

Die Analysen der oberirdischen Trockenmasse der angezogenen Pflanzen auf die Gehalte an Stickstoff, Phosphor, Kalium und Magnesium wurden ebenfalls wie bei Scheer (2001) und Niessing (2005) beschrieben durchgeführt.

2.7 Material für molekularbiologische Arbeiten

Die für die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) benötigten Komponenten *Taq* DNA Polymerase (rekombinant), PCR-Puffer (ohne MgCl₂, 10x) sowie Magnesiumchlorid (MgCl₂) wurden von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe bezogen. Das u.a. zum Lösen der Primer und zum Ansetzen der PCR-Reaktionen genutzte hochreine Wasser und auch die Desoxyribonukleotide (dNTPs) waren von der Firma Carl Roth GmbH+Co, Karlsruhe. Alle verwendeten Primer (siehe Tab. 4) wurden von der Firma Invitrogen GmbH, Karlsruhe synthetisiert.

Tab. 4: Verwendete PCR-Primer

Bezeichnung	Sequenz (5'-3')	Referenz
ACCF	ATGAACCTGAATCGTTTTRAA	Kamala-Kannan et al. (2010)
ACCr	TCAGCCGTTGCGRAACARGAA	Kamala-Kannan et al. (2010)
ERIC2	AAGTAAGTGACTGGGGTGAGCG	Versalovic et al. (1991)
fPs16S	ACTGACACTGAGGTGCGAAAGCG	Locatelli et al. (2002)
pA	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG	Edwards et al. (1989)
pH	AAGGAGGTGATCCAGCCGCA	Edwards et al. (1989)
Ps-for	GGTCTGAGAGGATGATCAGT	Widmer et al. (1998)
Ps-rev	TTAGCTCCACCTCGCGGC	Widmer et al. (1998)
rPs23S	ACCGTATGCGCTTCTTCACTTGACC	Locatelli et al. (2002)

Die in der Gelelektrophorese genutzten Längenstandards GeneRuler™ DNA Ladder Mix (#SM0331) und Prestained Protein Molecular Weight Marker (#SM0441) sowie Proben-Ladepuffer (6x) wurden von der Firma MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot erworben.

Die Bezeichnungen und Bezugsquellen der im Rahmen der Arbeit genutzten molekularbiologischen Kits zur Aufreinigung von PCR-Produkten, Extraktion von Gesamt-DNA aus Bakterienzellen oder auch zur Transposon-Mutagenese von Zellen sind in den jeweiligen Abschnitten näher beschrieben.

2.8 Isolierung und Charakterisierung von Rhizobakterien

2.8.1 *In situ* Probenahmen

Am 07.03.07 und 10.05.07 fanden Probenahmen auf der Rückstandshalde des Kaliwerks Sigmundshall in Bokeloh bei Wunstorf am teilweise begrünten Südhang der Halde statt (siehe Abb. 5). Dafür wurden jeweils mehrere, etwa 15 x 15 cm messende und ca. 20 cm tiefe Spatenausstiche des dort gewachsenen Deutschen Weidelgrases (*Lolium perenne*) aus dem Substrat gelöst und einzeln in Plastikbeuteln verschlossen. Nach der Rückkehr in das Labor folgte die Lagerung der Pflanzen bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung am nächsten Tag.

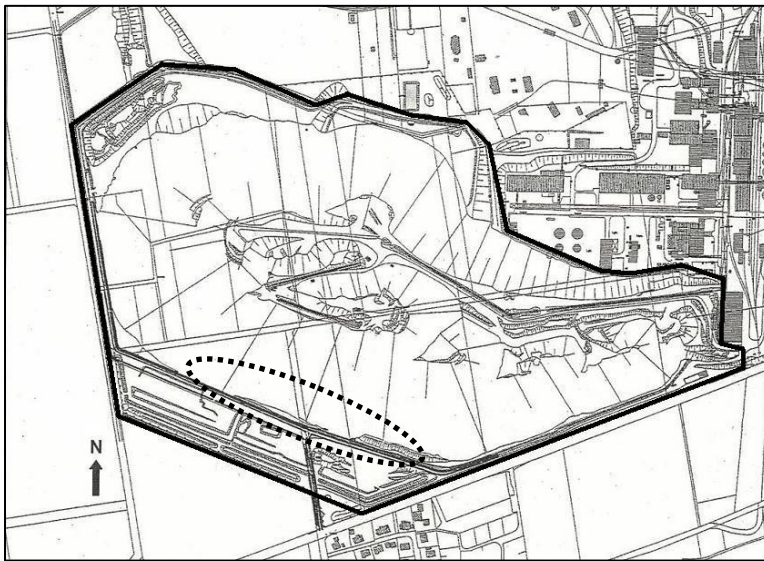


Abb. 5: Übersichtskarte der Rückstandshalde des Kaliwerks Sigmundshall

Das Gelände der Halde ist schwarz umrandet. Die Probenahmen erfolgten am Südhang der Halde (gestrichelte Linie). Darstellung nach Niessing (2005).

2.8.2 Probenbearbeitung

Unter sterilen Bedingungen entnahm man von den Pflanzen Wurzeln und befreite diese mit der Pinzette von größeren Partikeln des Abdecksubstrats. Dann wurden die Wurzeln Götz et al. (2006) folgend mit dem Skalpell zerkleinert, vermisch und von den Wurzelfragmenten 0,1 g zusammen mit 0,2 g sterilen Glaskügelchen ($\varnothing = 0,17\text{-}0,18\text{ mm}$) in 0,9 ml Kochsalzlösung viermal für jeweils 10 s bei höchster Stufe gevortext. Daraufhin schlossen sich das Anlegen von Verdünnungsreihen dieser Wurzelsuspensionen und das Ausplattieren auf NBRIP-Platten (Nautiyal 1999) mit Cycloheximid und Nystatin (jeweils $50\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) an, um phosphatsolubilisierende Bakterien erkennen zu können. Während der Inkubation der Platten bei 28°C für bis zu 10 d fand täglich die Kontrolle auf Wachstum von Bakterienkolonien mit klarem Hof statt (vgl. Abschnitt 2.8.4). Hierbei erfolgte die Überimpfung dieser Stämme auf neue NBRIP-Platten, um die Solubilisierungsfähigkeit weiter zu beurteilen und ggf. Mischkulturen zu vereinzeln. Geeignete Bakterienisolate wurden schließlich auf Standard-I-Nährmedium überimpft und hiervon dann Dauerkulturen angelegt und bei -20°C gelagert.

2.8.3 Erste Charakterisierung der Rhizobakterien

Die aufgrund ihrer Fähigkeit zur Phosphatsolubilisierung auf NBRIP-Agarplatten isolierten Rhizobakterien wurden zunächst exemplarisch auf ihre Solubilisierungsleistung in Flüssigmedium geprüft (siehe Abschnitt 2.8.4). Hierbei erfolgte das Aussortieren von Stämmen, die weniger als 100 µg Phosphat pro Milliliter lösen konnten. Dem schloss sich die Untersuchung der verbliebenen Isolate auf Zellmorphologie und Motilität am Phasenkontrastmikroskop BH-2 (Olympus, Hamburg) bei 1000facher Vergrößerung an. Weitere einleitende Charakterisierungsschritte waren eine Gram-Färbung sowie der Test auf Oxidase-Aktivität mittels Kit bzw. Teststreifen nach Herstellerangaben (Merck KGaA, Darmstadt), der Nachweis der Fluoreszenz unter Bestrahlung mit UV-Licht (366 nm) auf Pseudomonas F-Agar sowie der Nachweis zweier Eigenschaften, die positiven Einfluss auf das Pflanzenwachstum nehmen können: Siderophoren-Produktion (Abschnitt 2.8.5) sowie ACC Deaminase-Aktivität (Abschnitt 2.8.6).

Isolate mit beiden Eigenschaften wurden daraufhin weiter charakterisiert und besonders auf ihre potentiellen Fähigkeiten zur Förderung von Pflanzenwachstum untersucht. Zur Darstellung der Verwandtschaftsverhältnisse der Isolate untereinander erfolgte zunächst eine *fingerprint*-PCR (Abschnitt 2.8.9). Nach der anhand von identischen Bandenmustern bestimmten Aussonderung von Klonen schloss sich die weitere Charakterisierung an. Neben der genaueren Untersuchung der Phosphatsolubilisierung auch unter gepufferten Bedingungen (Abschnitt 2.8.4) erfolgte weiterhin der Nachweis, ob die Isolate die Fähigkeit zur Auxin-Synthese besitzen (Abschnitt 2.8.7). Zu Identifizierungszwecken diente neben dem Katalase-Test auch die Untersuchung der Stämme im API Schnelltestsystem (bioMérieux, Frankreich) nach Herstellerangaben (aber mit verlängerter Inkubationszeit von bis zu vier Tagen). Weiterhin folgte eine PCR zum Nachweis der Zugehörigkeit der Stämme zum Genus *Pseudomonas* (Abschnitt 2.8.8), wobei die Amplikons dieser PCR, die etwa 990 bp der 16S rDNA der jeweiligen Stämme repräsentierten, ebenfalls sequenziert und die Basenfolgen mit Datenbanken abgeglichen wurden (Abschnitt 2.8.10).

Geeignete Isolate mit allen vier oben beschriebenen PGPR-Eigenschaften wurden daraufhin *in vivo* auf ihren Einfluss auf das Wachstum der Pionierpflanze *Lolium perenne* getestet (siehe Abschnitt 2.9).

2.8.4 Nachweis der Phosphatsolubilisierung

Die Fähigkeit der isolierten Rhizobakterien, anorganisch gebundenes Phosphat in Lösung zu bringen (Phosphatsolubilisierung), wurde in NBRIP-Medium nach Nautiyal (1999) bestimmt. In diesem Medium liegt als einzige P-Quelle unlösliches Phosphat in Form von Tricalciumphosphat [TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$] vor, welches für eine Trübung des Nährmediums sorgt. Auf Agarplatten zeigen solubilisierende Isolate um ihre Kolonien klare Höfe, in denen die Phosphatverbindungen abgebaut wurden. In Flüssigmedium kann das durch die Bakterien in Lösung gebrachte Phosphat direkt gemessen werden, wofür hier ein photometrisches Nachweisverfahren (DIN EN 1189 : 1996) Anwendung fand. In Anlehnung an Gyaneshwar et al. (1998) wurde das Medium teilweise mit Tris HCl (Endkonzentration 50 mM bzw. 100 mM) auf einen pH-Wert von 8,0 gepuffert, der ungefähr dem Wert des Abdecksubstrats entspricht. Diese Abwandlungen des Ursprungsmediums erhielten die Bezeichnungen NBRIP50 bzw. NBRIP100.

Die Quantifizierung der Solubilisierungs-Fähigkeit fand zunächst im ungepufferten NBRIP, später auch in den gepufferten NBRIP50 und NBRIP100 statt. Bei der exemplarischen Erhebung aller Isolate wurde je Stamm eine Kolonie von einer frischen Standard-I-Nährmedium-Platte (ca. 18-24 h) abgenommen und in 10 ml ungepuffertes Medium eingerührt. Für die genauere Untersuchung interessanter Isolate erfolgte die Inokulation von jeweils 20 ml der drei verschiedenen Medien mit je ca. 10^8 CFU. Die gleiche Menge unbeimpften Mediums diente jeweils als Negativkontrolle. Nach der Inkubation für 7 d bei 28°C und 180 rpm wurden von jedem Ansatz 1,5 ml abgenommen und bei 15000 g für 5 min zentrifugiert. Nun schlossen sich die Überführung von je 1,0 ml der zell- und TCP-freien Überstände und an diesen die Messung der gelösten Phosphatgehalte an (nach DIN EN 1189 : 1996). Dazu wurden in mit *A. bidest* mehrfach gespülten Gefäßen ca. 45 ml *A. bidest* mit 50 µl, 500 µl oder 1000 µl der Probe versetzt und nacheinander 1 ml Ascorbinsäure-Lösung und 2 ml saure Molybdat-Lösung I hinzu gegeben. Nach dem Auffüllen auf 50 ml und dem anschließenden kräftigen Schütteln folgten die Inkubation für 25 min bei RT sowie die Messung der optischen Dichte bei 880 nm (OD_{880}) gegen eine phosphatfreie, nach demselben Prinzip angefärbte Blindprobe aus reinem *A. bidest*.

Eine wie oben angefärbte und gemessene Eichreihe diente der Bestimmung des gelösten Phosphats in den einzelnen Ansätzen. Hierfür wurde *A. bidest* mit Orthophosphat-Standardlösung ($2 \mu\text{g ml}^{-1}$) und den Färbelösungen versetzt und auf je 50 ml aufgefüllt, um Lösungen in den Konzentrationen 40, 200, 400, 800 und 1200 ng ml^{-1} zu erhalten.

Die letztlich durch die Isolate in Lösung gebrachte Menge an Phosphat ergab sich dann aus der Differenz der Werte der inokulierten Ansätze und der entsprechenden unbeimpften

Negativkontrollen der einzelnen Medien, da bereits beim Autoklavieren der Medien ein geringer Anteil des gebundenen Phosphats in Lösung geht (Whitelaw et al. 1999).

2.8.5 Nachweis der Siderophorenproduktion

Der Test auf die Produktion von bakteriellen Siderophoren durch die Rhizosphärenisolate geschah über das universelle Nachweisverfahren nach Schwyn & Neilands (1987), welches die Siderophoren unabhängig von deren chemischem Aufbau detektieren kann. Hierfür wurden die Bakterienstämme auf CAS-Agar überimpft und bis zu 48 h bei 28°C inkubiert. Dem im Medium vorliegenden blauen Indikatorkomplex (aufgebaut aus Chromazurol S, Eisen(III)-Ionen und dem Detergens HDTMA) wird von gebildeten Siderophoren das Eisen entzogen, was eine Verfärbung des Agars von blau zu orange bewirkt.

2.8.6 Nachweis der ACC Deaminase-Aktivität

Der vorläufige Nachweis des Enzyms ACC Deaminase bei den isolierten Rhizobakterien erfolgte durch Anzucht der Stämme in M9-Minimalflüssigmedium, dem als einzige Stickstoffquelle 3 mM ACC zugegeben wurde (M9+ACC). Nach der Inokulation von 5 ml des Mediums mit einer frischen Kolonie und der anschließenden Inkubation der Ansätze bei 28°C und 140 rpm für bis zu 7 d deutete eine Trübung des Mediums auf Wachstum und somit Aktivität des Enzyms hin.

2.8.7 Nachweis der Auxinproduktion

Die Untersuchung der Isolate auf eine Produktion von Auxinen bzw. Indol-3-Essigsäure-Äquivalenten fand in Minimal- und Vollmedien statt, welche zum Teil die chemische Auxin-Vorstufe Tryptophan enthielten. Je nach Versuchsanordnung wurden von M9-Minimalmedium oder Standard-I-Nährmedium jeweils 20 ml bei Bedarf mit L-Tryptophan für eine Endkonzentration von 1 mM versetzt und alle Ansätze mit 10^8 CFU beimpft. Nach einer Inkubation von 48 h bei 28°C und 140 rpm erfolgte zunächst die Ermittlung der Zelldichte im Ansatz durch Messung der Optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}), dem schloss sich dann die Zentrifugation von 1 ml des Ansatzes für 5 min bei 15000 g an. Vom Überstand wurden 400 µl abgenommen und mit 400 µl Salkowski-Reagenz in einer Küvette durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gemischt, dann erfolgten die Inkubation der Ansätze für 30 min bei RT im Dunkeln und die anschließende Messung der Optischen Dichte bei 540 nm (OD_{540}) gegen frisches, wie oben angefärbtes Medium als Referenz (Glickmann & Dessaux 1995).

Anhand einer Eichgerade aus Indol-3-Essigsäure in den Konzentrationen 0, 2, 5, 10, 20 und 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ im jeweiligen Medium fand abschließend die Berechnung der von den Bakterien synthetisierte Menge von Auxin bezogen auf die Zelldichte [$\mu\text{g ml}^{-1}$ OD₆₀₀⁻¹] statt.

2.8.8 Nachweis der Zugehörigkeit zum Genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*)

Um Stämme der Gattung *Pseudomonas* (*sensu stricto*) in Umweltproben nachzuweisen, etablierten Widmer et al. (1998) nach Sequenzdatenbank-Abgleichen ein hochselektives PCR-Protokoll, dessen Primer Ps-for und Ps-rev genus-spezifisch an der 16S rDNA ansetzen (siehe Abb. 6). Bei dem Typstamm *P. aeruginosa* ATCC 10145 binden sie an den Stellen 289 bis 308 (Ps-for) bzw. 1258 bis 1275 (Ps-rev) des Gens, welche homolog zu den Positionen 292 bis 311 bzw. 1263 bis 1280 von *Escherichia coli* sind. In der PCR wird ein etwa 990 bp langes Amplikon gebildet, dessen RFLP-Analyse mit dem Enzym *Hae*III die Zugehörigkeit zum Genus *Pseudomonas* verifizieren kann.

Der 25 μl -Ansatz je PCR-Reaktion bestand aus 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,1 μM der Primer, 1 U *Taq* DNA Polymerase sowie 2 μl DNA-Template-Lösung in 1x PCR-Puffer. Als Template-Lösung dienten jeweils 200 μl A. bidest, in die eine Kolonie suspendiert wurde. Nach 5 min initialer Denaturierung bei 94°C folgten 35 Zyklen mit jeweils 1 min bei 94°C, 1 min bei 65°C und 1 min bei 72°C sowie eine finale Extension von 10 min bei 72°C. Die Amplikons wurden dann auf einem 1%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer elektrophoriert und mit Ethidiumbromid angefärbt.

2.8.9 Erstellung von genetischen *fingerprints* mittels rep-PCR

In einer sog. rep-PCR werden die zahlreichen repetitive Elemente in bakteriellen Genomen als Bindungsstellen für Primer genutzt. Somit lassen sich die Regionen zwischen nicht zu weit voneinander entfernten Elementen amplifizieren, was zur Bildung verschieden langer Amplikons führt. Diese stellen sich in der Gelelektrophorese als genomischer Fingerabdruck (*fingerprint*) dar, da die Verteilung der repetitiven Elemente innerhalb von Gattungen, Spezies und sogar Subspezies und verschiedenen Stämmen stark variieren kann. Eine Art dieser repetitiven Elemente sind die *enterobacterial repetitive intergenic consensus* (ERIC) Sequenzen, die in einer modifizierten rep-PCR nach Versalovic et al. (1991) genutzt werden. Der Primer ERIC2 bindet hierbei an den *inverted repeat* innerhalb der ca. 126 bp langen ERIC-Sequenz.

In je 25 μl PCR-Ansatz befanden sich 5 mM MgCl₂, 0,25 mM je dNTP, 2 μM Primer ERIC2, 1 U *Taq*-Polymerase und 2 μl DNA-Template oder 50 ng DNA in 1x PCR-Puffer. Als

Template-Lösung diente eine Zellsuspension aus 2-3 Kolonien in 200 µl oder aufgereinigte DNA. Das PCR-Programm bestand aus einer initialen Denaturierung von 4 min bei 94°C gefolgt von 40 Zyklen mit je 30 s bei 94°C, 1 min bei 52°C und 4 min bei 72°C. Abschließend folgte eine Elongation für 8 min. Auf einem 1,5%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer wurden dann die *fingerprint*-Muster elektrophoretisch aufgetrennt und durch Färbung mit Ethidiumbromid dargestellt.

2.8.10 Analyse von Gensequenzen

Zur Ermittlung der Basenabfolge verschiedener Gene oder DNA-Abschnitte erfolgten Sequenzierarbeiten durch die Firma Seqlab (Sequence Laboratories Göttingen GmbH, Göttingen).

Interessante PCR-Produkte wurden mit dem Wizard[®] SV GEL and PCR Clean-Up System (Promega, U.S.A.) aufgereinigt und vom Forward- und/oder Reverse-Primer aus direkt sequenziert, wobei nach Angaben der Dienstleister (siehe oben) verfahren wurde. In speziellen Fällen (siehe Abschnitt 2.10.5.2) diente extrahierte und aufgereinigte Gesamt-DNA in unterschiedlichen Konzentrationen als Template-DNA für die Sequenzierreaktionen.

Die gewonnenen Sequenzdaten wurde daraufhin mit dem Computerprogramm BioEdit (Hall 1999) manuell bearbeitet und anschließend mit den gesicherten Sequenzen ein Datenbankabgleich (BLASTN, Version 2.2.23+, Zhang et al. 2000) durchgeführt.

Im Text (siehe z.B. Abschnitt 2.10.2) angegebene Gensequenzen aus der Datenbank NCBI (National Center for Biotechnology Information, www.ncbi.nlm.nih.gov/) sind mit der jeweiligen Zugangsnummer (Accession No.) in Klammern versehen.

2.9 Untersuchung der Rhizobakterien anhand von Pflanzenversuchen

2.9.1 Markierung von Bakterien mit spontanen Antibiotika-Resistenzen

Bei Bedarf fand die Induktion einer spontanen Resistenz gegen die Antibiotika Rifampicin und/oder Streptomycin bei den Isolaten statt, indem je Stamm eine trübe Zellsuspension in Kochsalzlösung (McFarland = ca. 4) auf Standard-I-Nährmedium mit den jeweiligen Antibiotika Rifampicin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) bzw. Streptomycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) ausplattiert und anschließend für bis zu 48 h bei 28°C inkubiert wurde. Die weitere Kultivierung der angewachsenen, spontan-resistenten Mutanten geschah daraufhin in entsprechenden antibiotikahaltigen Medien, um den Verlust der Resistenz zu verhindern.

2.9.2 Oberflächensterilisation der Grassamen

Die Oberflächensterilisation der Samen von *Lolium perenne* erfolgte zunächst durch Schwenken in Ethanol (70%) für 1 min und dem nachfolgenden gründlichen Spülen mit sterilem A. bidest. Danach wurden die Samen für 1 h in einer Lösung aus Natriumhypochlorit (ca. 13% aktives Chlor) mit 0,1% Tween[®] 20 langsam geschüttelt. Dann schlossen sich das mindestens dreimalige, gründliche Waschen mit sterilem A. bidest sowie die Trocknung der Samen in der sterilen Werkbank für mehrere Stunden an.

Zur Kontrolle der Sterilisation wurden 0,1 g der Samen in 0,9 ml Kochsalzlösung viermal für je 30 s gevortext und eine Verdünnungsreihe der Suspension ausplattiert. Während der Inkubation dieser Platten für bis zu 7 d bei 28°C fand die regelmäßige Kontrolle auf eventuell auftretendes Wachstum von Mikroorganismen statt.

2.9.3 Inokulation der Grassamen

Die Inokulation der oberflächensterilisierten Samen erfolgte modifiziert nach Chang (2007) mittels Methylcellulose als Haftmittel. Eine Kultur des jeweiligen Bakterienstamms in Standard-I-Nährmedium wurde über Nacht (ca. 18 h) bei 28°C und 140 rpm herangezogen und anschließend bei 1000 g für 10 min zentrifugiert. Es folgte das Waschen des Pellets in Natriumpyrophosphat-Lösung (0,1%), was dem Entfernen sekundärer Metabolite diente. Daraufhin wurden die Zellen in steriler Methylcellulose-Lösung (0,25%) bis zu einer OD_{600} von ca. 2,0 bis 3,0 resuspendiert und in dieser Suspension die Samen für 30 min bei RT und 50 rpm geschüttelt. Anschließend erfolgten die Trocknung der Samen in der sterilen Werkbank sowie die Lagerung der inokulierten Samen in luftdichten Schraubröhrchen bei 4°C .

Die Ermittlung der Anzahl der auf den Samen anhaftenden Zellen (CFU g⁻¹ Samen) fand statt, indem 0,1 g der getrockneten Samen in 0,9 ml Kochsalzlösung viermal für je 10 s gevortext und eine Verdünnungsreihe der Suspension ausplattiert wurde.

2.9.4 Herstellung der Alginat-Kugeln

Die Herstellung der Alginat-Kugeln geschah in Anlehnung an Bashan (1986a). Vom jeweiligen Bakterienstamm wurde eine Kultur in TYG-Bouillon angesetzt und über Nacht (ca. 18 h) bei 28°C und 140 rpm inkubiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens einer sterilen Natriumalginat-Lösung (4,0%) zur Zellsuspension erfolgte eine weitere Inkubation des Gemischs bei 140 rpm und RT für 1 bis 2 h. Mittels einer sterilen Einwegspritze samt Kanüle folgte daraufhin tropfenweise die Zugabe des Gemischs in eine sterile Calciumchlorid-Lösung (0,1 M), wobei sich sofort die festen Alginat-Kugeln zum Boden des Gefäßes absenkten. Anschließend wurden die Kugeln für 1 bis 2 h bei RT und 140 rpm weiter geschüttelt und dann die Calciumchlorid-Lösung entfernt. Nach dem zweimaligen Waschen in sterilem Leitungswasser erfolgte entweder direkt die Lagerung der Kugeln bei 4°C oder in der Regel eine weitere Inkubation in frischer TYG-Bouillon für ca. 24 h bei RT und 140 rpm, was der weiteren Vermehrung der Zellen innerhalb der Kugeln dienen sollte. Daraufhin wurden diese Kugeln erneut zweimal gewaschen und in luftdichten Schraubröhrchen bis zur weiteren Nutzung bei 4°C gelagert.

Das Auflösen von 1 g der Kugeln in 9 ml sterilem Kaliumphosphatpuffer (0,25 M) sowie das darauffolgende Ausplattieren einer Verdünnungsreihe gaben Aufschluss über die Zahl der in den Kugeln immobilisierten Zellen (CFU g⁻¹).

Um zu überprüfen, ob die Zugabe des Trägermediums Alginat allein schon einen Effekt auf das Wachstum der untersuchten Pflanzen hat, erfolgte durch Abwandlung des Standard-Protokolls die Herstellung steriler Alginat-Kugeln ohne Bakterien. Dazu wurden frisches TYG-Medium und sterile Natriumalginat-Lösung (4,0%) im Verhältnis 1 : 1 gemischt und für 1 bis 2 h bei RT und 140 rpm inkubiert. Nach dem Eintropfen des Gemischs und dem weiteren Schütteln der entstandenen Kügelchen in der Calciumchlorid-Lösung folgten das zweimalige Waschen in sterilem Leitungswasser und die luftdichte Lagerung der sterilen Kugeln bei 4°C.

2.9.5 Durchführung und Aufbau der Gewächshausversuche

Alle Gewächshausexperimente fanden in den Einrichtungen des Fachbereichs "Ökologische Agrarwissenschaften" der Universität Kassel in Witzenhausen statt. Als Anzuchttöpfe kamen Pflanzkulturgefäße des Systems "Kick/Brauckmann" (Stoma GmbH, Siegburg) zum Einsatz, die aus Kulturgefäß mit Wasserablauf und bodenlosem Einsatztopf bestehen. In der Regel setzte sich jede der unterschiedlichen Varianten in den einzelnen Gewächshausversuchen aus fünf Töpfen zusammen ($n=5$). Pro Topf wurden etwa 8 L Substrat eingefüllt und durch vorsichtiges Klopfen der Gefäße auf den Boden gut verdichtet. Mischproben jeder Variante bestehend aus wenigen Gramm Substrat pro Topf dienten der Untersuchung auf die Parameter pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit (mS cm^{-1}) und Trockensubstanzanteil (%TS). Aus dieser Trockensubstanz erfolgte ebenfalls eine Analyse auf die Gehalte an Stickstoff (%N) sowie Phosphor (P), Kalium (K), Magnesium (Mg) und Chlorid (Cl, jeweils in mg pro 100 g Trockensubstanz).

Die gedüngten Varianten der einzelnen Gewächshausversuche wurden vor der Aussaat pro Topf mit 0,42 g Kalkammonsalpeter (27% N) und 0,59 g Tripelphosphat (45% P) bestreut, was etwa 30 kg Stickstoff bzw. 70 kg Phosphor pro Hektar entspricht. Weitere Düngungen erfolgten mit je 0,76 g NPK-Volldünger (15%/15%/15%), was pro Nährstoff ungefähr einer Menge von 30 kg ha^{-1} gleichkommt. Die Saat bestand pro Topf aus 1,2 g Samen von *Lolium perenne* (entspricht ca. 300 kg ha^{-1}), wobei hauptsächlich oberflächensterilisierte, teilweise aber auch zusätzlich in Methylcellulose inokulierte Samen Verwendung fanden. Die Bewässerung erfolgte bei Bedarf mit Leitungswasser, innerhalb der ersten ein bis zwei Wochen kam hierfür ein feiner Sprühnebel zum Einsatz, um die Samen nicht wegzuspülen.

In jedem der Gewächshausexperimente erfolgte nach etwa 100 d das erste Mal die Bestimmung der oberirdischen Biomasse, nach etwa weiteren 30 d schloss sich ggf. der zweite Schnitt an. Bei diesen Ernten wurde einzeln von jedem Topf mit einer Schere etwa 1-2 cm über dem Substrat die Frischmasse abgeschnitten und sofort das Gewicht des Pflanzmaterials ermittelt. Dann folgten die Trocknung der Biomasse bei 80°C bis zur Massenkonzanz und die anschließende Trockenmassebestimmung. Abschließend fand in der Regel die Analyse der Trockensubstanz (TS) auf den Gehalt der Nährstoffe Stickstoff (%N), sowie Phosphor, Kalium und Magnesium (jeweils in mg pro 100 g TS) statt.

Zur Bestimmung der Wurzelmasse ließ man die Töpfe ausgewählter Varianten nach der letzten Ernte für mehrere Wochen zum Austrocknen stehen. Dann wurde das Substrat mitsamt des Wurzelapparats vorsichtig aus den Töpfen entfernt, das trockene Anzuchtmaterial vom Wurzelballen durch sanftes Schütteln und Klopfen gelöst und die Wurzeln anschließend in Leitungswasser mehrere Minuten gespült, bis die letzten Reste des Substrats entfernt waren.

Es schlossen sich nun die Trocknung der separaten Wurzelballen bei 80°C bis zur Massenkonstanz und daraufhin die Ermittlung der Trockenmasse an.

Ausgehend von der Substratoberfläche in den Kulturgefäßen erfolgte für die Darstellung der Ergebnisse eine Hochrechnung der Frisch- bzw. Trockenmassewerte pro Topf [g] auf die Gesamtmasse pro Hektar [dt ha⁻¹], um mit Literaturwerten vergleichen zu können. Hierfür galt, dass die Oberfläche von 26,25 Töpfen einem Quadratmeter entspricht.

2.9.5.1 Erster Gewächshausversuch

Das erste Gewächshausexperiment diente der Untersuchung, ob die vier Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8 Einfluss auf das Wachstum von *L. perenne* nehmen können. Als Substrat kam entsalztes REKAL/SAV zum Einsatz und zur Pflanzeninokulation wurden Alginat-Kugeln genutzt (siehe Tab. 5). Der Versuch startete am 24.06.08 und am 23.07.08 erfolgte die zweite Düngung. Der erste Schnitt der oberirdischen Biomasse fand am 02.10.08 (nach 100 d) statt, der zweite am 04.11.08 (nach 133 d).

Tab. 5: Aufbau des ersten Gewächshausversuchs

Variante	Töpfe	Substrat	Düngung	Inokulation
1.A	1-5	REKAL/SAV	---	---
1.B	6-10	REKAL/SAV	N, P, K	---
1.C	11-15	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 1.8, 10 g Kugeln pro g Samen
1.D	16-20	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, 10 g Kugeln pro g Samen
1.E	21-25	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.5, 10 g Kugeln pro g Samen
1.F	26-30	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.8, 10 g Kugeln pro g Samen

2.9.5.2 Zweiter Gewächshausversuch

Der zweite Gewächshausversuch hatte die weitere Untersuchung der pflanzenwachstumsfördernden Eigenschaften des Isolats 2.2 sowie die Evaluation verschiedener Variationen in der Inokulation zum Zweck (siehe Tab. 6). Als Substrat diente hauptsächlich entsalztes REKAL/SAV, diesem wurde in den Varianten 2.C und 2.D jedoch Kompost beigemischt (762 g pro Topf, was etwa 200 t ha⁻¹ entspricht) und hier auf eine Zugabe von Mineraldünger verzichtet. In den Varianten 2.K und 2.L fand anstelle des Abdecksubstrats normaler Ackerboden Verwendung. Der Beginn des Experiments war am 13.11.08, wobei hier nur die Varianten mit purem REKAL/SAV als Substrat Dünger erhielten. Erneut gedüngt wurde am

12.12.08 und am 13.01.09, wobei hier auch jeweils die Gefäße mit Ackerboden mit dem NPK-Dünger versehen wurden. Die erste Ernte der oberirdischen Biomasse erfolgte am 26.02.09 (nach 105 d). Die ermittelten Frischmassewerte dienten hierbei der Einteilung der jeweils zehn Töpfe der Varianten 2.A und 2.B in je zwei Untervarianten á fünf Töpfe mit gleicher durchschnittlicher Frischmasse. Die Untervarianten 2.A2 und 2.B2 wurden daraufhin mit jeweils 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen nachbeimpft. Bei diesem ersten Schnitt erfolgte die Analyse der oberirdischen Biomasse nur auf die Gehalte an Stickstoff und Phosphor. Der zweite Schnitt des oberirdischen Pflanzenmaterials fand am 02.04.09 (140 d) statt, und ab diesem Zeitpunkt wurden die Töpfe nicht mehr gegossen und zum Austrocknen stehen gelassen, bis sich am 18.06.09 (217 d) die Wurzelernte der Ansätze 2.A, 2.E und 2.J anschloss.

Tab. 6: Aufbau des zweiten Gewächshausversuchs

a) Die Kugeln in Ansatz 2.I wurden nach der Herstellung nicht erneut inkubiert (vgl. Abschnitt 2.9.4)

Variante	Töpfe	Substrat	Düngung	Inokulation
2.A	1-10	REKAL/SAV	N, P, K	---
2.B	11-20	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, 10 g Kugeln pro g Samen
2.C	21-25	REKAL/SAV	Kompost	---
2.D	26-30	REKAL/SAV	Kompost	Isolat 2.2, 10 g Kugeln pro g Samen
2.E	31-35	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, 5 g Kugeln pro g Samen
2.F	36-40	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, 15 g Kugeln pro g Samen
2.G	41-45	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, 20 g Kugeln pro g Samen
2.H	46-50	REKAL/SAV	N, P, K	10 g sterile Kugeln pro g Samen
2.I	51-55	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, 10 g Kugeln pro g Samen ^a
2.J	56-60	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, inokulierte Samen
2.K	61-65	Ackerboden	N, P, K	---
2.L	66-70	Ackerboden	N, P, K	Isolat 2.2, 10 g Kugeln pro g Samen

2.9.5.3 Dritter Gewächshausversuch

Am 16.07.09 begann das dritte Gewächshausexperiment, welches wiederum die Nutzbarkeit des Isolats 2.2 und zudem dessen Vermögen zur Besiedlung des Wurzelapparates verdeutlichen sollte. Hierfür dienten in Variante 3.D Alginat-Kugeln mit antibiotikaresistenzmarkierten Zellen des Isolats (Rif^r, Sm^r) (siehe Tab. 7). Nach dem weiteren Düngen am

21.08.09 und 11.09.09 schloss sich die Ernte der oberirdischen Biomasse am 29.10.09 (nach 105 d) an. Zu diesem Zeitpunkt erfolgten zusätzlich sowohl von der Kontrolle (3.A) als auch von der Variante 3.D die zufällige Entnahme weniger Gramm Wurzeln aus jedem Topf sowie die kühle Lagerung der Proben in sterilen Schraubdeckelröhrchen bis zur weiteren Untersuchung. Im Labor wurden dann je Topf 1 g der zerstückelten und vermischten Wurzelfragmente mit 9 ml steriler Kochsalzlösung versetzt, die Ansätze viermal je 10 s gevortext und Verdünnungsreihen auf Standard-I-Nährmedium mit jeweils $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Nystatin, Cycloheximid, Rifampicin und Streptomycin ausplattiert. Vom dritten Gewächshausversuch fand kein zweiter Schnitt statt.

Tab. 7: Aufbau des dritten Gewächshausversuchs

Variante	Töpfe	Substrat	Düngung	Inokulation
3.A	1-5	REKAL/SAV	N, P, K	---
3.B	6-10	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, 10 g Kugeln pro g Samen
3.C	11-15	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2, inokulierte Samen
3.D	16-20	REKAL/SAV	N, P, K	Isolat 2.2 Rif ^r Sm ^r , 10 g Kugeln pro g Samen
3.E	21-24	REKAL/SAV	---	---
3.F	25-28	REKAL/SAV	---	Isolat 2.2, 10 g Kugeln pro g Samen

2.9.6 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung

Um die Besiedlung des Wurzelapparats von *L. perenne* durch das Isolat 2.2 untersuchen zu können, wurde der Stamm mit dem Gen für das grün fluoreszierende Protein (*green fluorescent protein*, GFP) versehen. Somit ließ sich das Isolat mittels Fluoreszenz-Mikroskopie direkt auf den Wurzeln nachweisen.

2.9.6.1 GFP-Markierung mittels Triparentalen Matings

Das GFP-Gen befand sich auf dem Plasmid pSM1890 (Haagensen et al. 2002), das über Triparentales Mating nach Peixoto et al. (2005) in eine Rifampicin-resistente Mutante (Rif^r) des Isolats 2.2 (siehe Abschnitt 2.9.1) übertragen wurde. Dafür erfolgte zunächst der Ansatz von Übernachtskulturen (bei 28°C und 140 rpm) der drei im Mating genutzten Stämme in je 5 ml Müller-Hinton-Bouillon (MH): Isolat 2.2 Rif^r (Rezipient) mit $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Rifampicin im Medium, *E. coli* cc118λpir (pSM1890) (Donor) mit $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Streptomycin und $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ Gentamycin und *E. coli* HB101 (RK600) (Helfer) mit $20 \mu\text{g ml}^{-1}$ Chloramphenicol. Es

schlossen sich die Zentrifugation von je 2 ml der angewachsenen Kulturen bei 15000 g für 5 min und die Resuspension der Pellets in je 2 ml LB-Bouillon an. Daraufhin wurden 200 µl von jeder Suspension abgenommen, vereint und nach dem Mischen erneut zentrifugiert. Nach der Resuspension des Pellets in 200 µl LB-Bouillon folgte das Tropfen von 50 µl der Suspension auf eine trockene MH-Agarplatte. Diese Platte wurde dann mit dem Deckel nach oben über Nacht bei 28°C inkubiert, im Anschluss das Zellmaterial entnommen und in 1 ml steriler Kochsalzlösung resuspendiert. Nun fand das Ausplattieren einer Verdünnungsreihe dieser Suspension in Kochsalzlösung auf MH-Platten mit Rifampicin (50 µg ml⁻¹), Streptomycin (50 µg ml⁻¹) und Gentamycin (10 µg ml⁻¹) statt. Nach ca. 48 h Inkubation wurden große Kolonien gepickt und jeweils auf den gleichen antibiotika-haltigen Platten ausgestrichen.

Eine Validierung der markierten Stämme erfolgte mittels rep-PCR (siehe Abschnitt 2.8.9). Verglichen wurden hierbei die *fingerprints* von Donor, Helfer und Isolat 2.2 mit den Mustern der nach dem Triparentalen Mating gepickten markierten Stämme. Das Erstellen von Wachstumskurven des erfolgreich markierten Isolats 2.2 (pSM1890) sowie des Wildtyps 2.2 diente der Beurteilung der eventuellen metabolischen Belastung durch die GFP-Markierung. Hierfür wurden von Wildtyp und markiertem Stamm Übernachtskulturen in Standard-I-Nährmedium [bei 2.2 (pSM1890) zusätzlich mit Rifampicin, Streptomycin und Gentamycin] bei 28°C und 140 rpm angezogen und am nächsten Morgen je 30 ml des gleichen frischen Mediums mit $1,5 \cdot 10^8$ CFU der jeweiligen Kulturen angeimpft und stündlich die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gemessen.

2.9.6.2 Inokulation und Anzucht der Pflanzen

Unter gnotobiotischen Bedingungen erfolgte die Untersuchung der Fähigkeit des Stamms 2.2 (pSM1890), die Wurzeln von *Lolium perenne* zu besiedeln. Dafür wurden kleine Plastik-Pflanzgefäße (oberer Durchmesser ca. 7 cm) mit autoklaviertem Abdecksubstrat befüllt (jeweils etwa 100 ml) und in jeden Topf zehn oberflächensterilisierte Samen gegeben. Zur Inokulation diente je eine neben jedem Samen platzierte Alginat-Kugel (mit etwa $2 \cdot 10^9$ CFU des GFP-markierten Isolats 2.2 pro Gramm Kugeln). Die Pflanzen wurden dann innerhalb eines Anzuchtkastens in einer Brutkammer angezogen und bei Bedarf mit sterilem A. bidest gegossen. In der Kammer herrschte ein Rhythmus von 10 h Dunkelheit und 14 h Helligkeit über Leuchtstoffröhren mit einer Lichtintensität von ca. 10 µmol m⁻² s⁻¹, die Temperatur betrug zwischen 20 und 25°C. Etwa zwei bis drei Wochen nach Aussaat erhielt ein Teil der

Töpfe keine Wasserversorgung mehr, um die Besiedlung der Wurzeln auch bei Austrocknungserscheinungen beurteilen zu können.

2.9.6.3 Untersuchung der Wurzelbesiedlung

Nach insgesamt ca. sechs Wochen fand die Analyse der Wurzelbesiedlung statt. Dafür wurden zunächst unter sterilen Bedingungen die Gräser vorsichtig aus den Töpfen gelöst und das Substrat soweit wie möglich von den Wurzeln entfernt. Daraufhin erfolgte das Abtrennen der Wurzel vom Rest der Pflanzen (an der Basis unterhalb der Samenhülle) mit einem sterilen Skalpell. Einzelne Wurzeln aus den gegossenen und ausgetrockneten Ansätzen dienten nach der Fixierung auf Objektträgern in einer Lösung aus 80% Glycerin in PBS schließlich der Untersuchung im Epifluoreszenz-Mikroskop Axiophot (Carl Zeiss Jena GmbH, Jena) mit dem Zeiss-Filter Nr. 487709 (BP 450-490, FT 510, LP 520). Hierbei wurden von interessanten Wurzelregionen sowohl Fluoreszenz- als auch Durchlichtbilder angefertigt und diese zur besseren Darstellung mit dem Programm Adobe Photoshop (Version 9.0) überlagert.

Von den Wurzeln der durchgängig gegossenen Pflanzen wurden zusätzlich in einem Reaktionsgefäß 0,1 g vereint und in 0,9 ml steriler Kochsalzlösung viermal für jeweils 10 s bei höchster Stufe gevortext. Nun folgten das Anlegen einer Verdünnungsreihe der Wurzelsuspension und das Ausplattieren auf Standard-I-Nährmedium sowohl ohne Antibiotika als auch mit Streptomycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) und Gentamycin ($10 \mu\text{g ml}^{-1}$). Nach der Inkubation bei 28°C für ca. 48 h fand die Bestimmung der Zellzahlen in CFU pro Gramm Wurzelfrischmasse statt, wobei die CFU mit Antibiotika im Medium den Stamm 2.2 (pSM1890) repräsentierten und die CFU auf den normalen Platten auch die Zellen des Stamms mit einschloss, die das Plasmid verloren hatten.

2.9.7 Rasterelektronenmikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung

Mittels Untersuchung im Rasterelektronen-Mikroskop (REM) sollte die Fähigkeit des Isolats 2.2 zur Besiedlung der Wurzeln von *Lolium perenne* weiter beurteilt werden.

2.9.7.1 Inokulation und Anzucht der Pflanzen

Gläserne Petrischalen ($\varnothing = \text{ca. } 10 \text{ cm}$) befüllte man mit REKAL/SAV, dann folgten die Befeuchtung des Substrats mit 10 ml A. bidest und das Autoklavieren für 20 min bei 121°C . Nach dem Abkühlen wurden pro Schale fünf oberflächensterilisierte Samen von *L. perenne* zusammen mit je einer Alginat-Kugel des Isolats 2.2 ($\text{ca. } 2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$) platziert, das Sub-

strat mit A. bidest durchnässt und die Schalen dann in der Gewächskammer bei 20 bis 25°C und einem Rhythmus von 10 h Dunkelheit und 14 h Helligkeit (ca. $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) inkubiert.

2.9.7.2 Präparation und Untersuchung der Wurzeln

Nach zehn Tagen wurden die Keimlinge vorsichtig aus dem Substrat gelöst und von größeren Partikeln befreit. Dann erfolgten die Abtrennung der Wurzeln vom Rest der Pflanzen mit einem sterilen Skalpell sowie die Fixierung der Wurzeln für mindestens 2 h bei RT in Glutardialdehyd-Lösung (2%). Nach dem dreimaligen Waschen in Soerensen-Puffer fand die Entwässerung der Proben in einer Ethanolreihe von aufsteigender Konzentration (30%, 50%, 70%, 80%, 85%, 90%, 94%, 97% und 100% für jeweils etwa 10 min) statt. Dann folgten die Kritische-Punkt-Trocknung der Proben sowie die Fixierung der getrockneten Wurzeln auf Mikroskophalterungen mittels selbstklebender, leitender Folie. Nach der Bedampfung mit Platin schloss sich die Untersuchung der Wurzeln bei einer Spannung von 10 kV im Rasterelektronenmikroskop (Hitachi S-4000, Japan) an.

2.9.8 Untersuchung zur Zelldichteabhängigkeit der Wachstumsförderung

Um zu überprüfen, ab welcher ungefähren Zellzahl im Medium eine Beeinflussung des Pflanzenwachstums zu sehen ist und ob hierbei auch negative Effekte auf die Pflanzen auftreten, fand ein *in vitro* Experiment in Anlehnung an Belimov et al. (2007) statt. Zur Anzucht dienten hierbei sterile Petrischalen mit für mehrere Stunden bei 180°C sterilisiertem Filterpapier (Whatman #1, Ø = 8,5 cm).

Eine Kolonie des Isolats 2.2 wurde zunächst in 10 ml Standard-I-Nährmedium eingerührt und der Ansatz über Nacht (ca. 18 h) bei 140 rpm und 28°C inkubiert. Einer Zentrifugation für 5 min bei 15000 g schloss sich die Resuspension des Pellets in 0,1% Natriumpyrophosphat an, dann folgten die erneute Zentrifugation sowie die Resuspension im gleichen Puffer, wobei das Einstellen der Zellsuspension auf eine OD₆₀₀ von 1,0 (entspricht etwa 10^9 CFU ml^{-1}) das Ziel war. Steriles A. bidest wurde dann mit dieser Zellsuspension versetzt, um Lösungen mit 10^5 CFU ml^{-1} , 10^6 CFU ml^{-1} , 10^7 CFU ml^{-1} und 10^8 CFU ml^{-1} zu erhalten. Man gab nun je 5 ml der Suspensionen in Petrischalen, in die dann erst eines der sterilen Filterpapiere und darauf pro Schale fünf sterile Samen platziert wurden. Nach der Inkubation für 10 d in einer Gewächskammer mit 20 bis 25°C und täglicher 14stündiger Helligkeit (etwa $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) erfolgte die Messung der Spross- und Wurzellänge der Keimlinge.

2.10 Genauere Untersuchung des Isolats 2.2

Das Rhizosphärenisolat 2.2, welches im Gewächshausversuch einen deutlichen förderlichen Einfluss auf das Wachstum von *Lolium perenne* zeigte, wurde genauer charakterisiert und identifiziert. Darüber hinaus erfolgten erste Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Pflanzenwachstums-Förderung.

2.10.1 Sequenzierung ribosomaler DNA

Die Sequenzierung eines größeren Abschnitts der 16S rDNA wurde mittels des Primerpaars pA und pH (Edwards et al. 1989) durchgeführt (siehe Abb. 6). Der 25 µl-Ansatz je PCR-Reaktion bestand aus 2 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,4 µM der Primer, 1 U *Taq* DNA Polymerase sowie 2 µl DNA-Template-Lösung in 1x PCR-Puffer. Als Template-Lösung dienten jeweils 200 µl A. bidest, in die eine frische Kolonie suspendiert wurde. Nach 5 min initialer Denaturierung bei 94°C folgten 30 Zyklen mit jeweils 45 s bei 94°C, 45 s bei 62°C und 90 s bei 72°C sowie eine finale Extension von 10 min bei 72°C. Vom Ansatz wurden 5 µl dann auf einem 1%igen Agarose-Gel in TAE elektrophoriert und mit Ethidiumbromid angefärbt. Der aufgereinigte Rest des Amplikons war DNA-Template für die Direkt-Sequenzierung von beiden Primern aus (siehe Abschnitt 2.8.10).

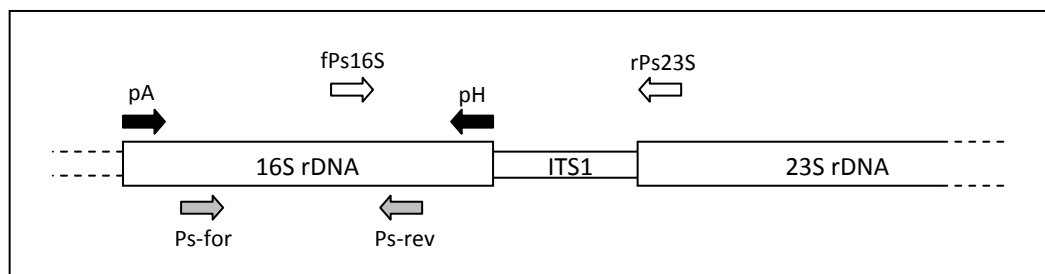


Abb. 6: Schematische Darstellung der rDNA-assozierten PCR-Protokolle

Stark vereinfacht dargestellt sind die Gene der 16S rDNA und 23S rDNA mit der dazwischen liegenden ITS1-Region sowie die Hybridisierungsstellen der in der Arbeit genutzten rDNA-assozierten PCR-Primerpaare (Pfeile, siehe auch Tab. 4).

Weißer Pfeil: Protokoll nach Locatelli et al. (2002), Amplikon ca. 1300 bp.

Schwarzer Pfeil: Protokoll nach Edwards et al. (1989), Amplikon ca. 1500 bp.

Grauer Pfeil: Protokoll nach Widmer et al. (1998), Amplikon ca. 990 bp.

Die Sequenzierung der zwischen der 16S rDNA und der 23S rDNA gelegenen ITS1-Region (*internal transcribed spacer*) (siehe Abb. 6) erfolgte mit dem Primerpaar fPs16S und rPs23S nach dem Protokoll von Locatelli et al. (2002). Der 25 µl-Ansatz je PCR-Reaktion setzte sich zusammen aus 3 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,25 µM der Primer, 0,5 U *Taq* DNA Polymerase sowie 2 µl DNA-Template-Lösung in 1x PCR-Puffer. Als Template-Lösung diente eine frische Kolonie, die in 200 µl A. bidest suspendiert wurde. Nach 5 min initialer

Denaturierung bei 94°C schlossen sich 35 Zyklen mit jeweils 1 min bei 94°C, 1 min bei 55°C und 1 min bei 72°C sowie eine finale Extension von 10 min bei 72°C an. Vom Ansatz wurden dann 5 µl auf einem 1%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer elektrophoriert und mit Ethidiumbromid angefärbt. Das PCR-Produkt wurde ebenfalls wie oben von beiden Seiten aus sequenziert.

2.10.2 Phylogenetische Analysen

Die durch Sequenzierung ermittelte Basenabfolge der 16S rDNA (siehe Abschnitt 2.10.1) wurde zusammen mit den publizierten Gensequenzen verschiedener, valider *Pseudomonas*-Typstämme (siehe Tab. 8) dazu genutzt, mit der Software MEGA Version 4.0.2 (Tamura et al. 2007) Stammbäume zur Verdeutlichung der Verwandtschaftsgrade zu erstellen.

Verwendung fanden hierbei gängige Rechenmethoden wie *Bootstrap*-Analysen (Felsenstein 1985), die *Minimum Evolution*-Methode (Rzhetsky & Nei 1992), die *Neighbor Joining*-Methode (Saitou & Nei 1987), der *Close Neighbor Interchange*-Algorithmus (Nei & Kumar 2000) sowie die *Kimura 2-Parameter*-Analyse (Kimura 1980). Als *Outgroup* diente jeweils *Escherichia coli* BW2952 (NC_012759).

2.10.3 Weitere Identifizierungs- und Charakterisierungsmaßnahmen

Der zusätzlichen Differenzierung des Isolats diente eine Analyse durch das automatisierte VITEK[®] 2 System (bioMérieux, Frankreich), wofür nach Herstellerangaben eine Karte GN [für gram-negative (nicht-)fermentative Bakterien] inokuliert wurde. Weiterhin erfolgte das Erstellen eines automatischen Antibioграмms mit der Karte AST-N118. Beide Tests fanden am VITEK[®] 2 XL System des Medizinischen Versorgungszentrums, Laboratoriumsmedizin und Mikrobiologie, Kassel statt. Dessen Mitarbeiter erstellten zudem ein manuelles Antibioграмm gemäß Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Stand: Januar 2008).

Eine Analyse des Musters der bakteriellen Fettsäuren (*fatty acid methyl ester*, FAME) erfolgte durch die Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ), Braunschweig. Der Abgleich geschah mit der Datenbank TSBA50 (Version 5.00).

Das Schnelltestsystem API 50 CH (bioMérieux, Frankreich) diente als Grundlage eines Tests der vom Isolat verwertbaren Kohlenstoff-Quellen. Zu diesem Zweck nahm man eine Abwandlung der Durchführung nach Herstellerangaben durch Nutzung des API AUX-Mediums des API 20 NE Testsystems als Anzuchtmedium vor. Von einer frischen Standard-I-Nährmedium-Platte wurden soviel Zellmaterial in 1,5 ml A. bidest eingerührt, bis die Trübung ungefähr einem McFarland Standard von 4,0 entsprach. Nach dem Vereinen dieser

Suspension mit ca. 14 ml API AUX-Medium und dem gründlichen Mischen schloss sich die Befüllung der einzelnen Röhrchen samt Becher an. Während der Inkubation für insgesamt 7 d bei 28°C erfolgte täglich die Kontrolle auf Bakterienwachstum anhand der eingetretenen Trübung der einzelnen Test-Kavitäten.

Tab. 8: 16S rDNA-Sequenzen verschiedener *Pseudomonas*-Typstämme

Zusammengetragen sind valide Stämme nach Euzéby (1997)

Stamm	Accession No.
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	X06684
<i>P. alcaligenes</i> ATCC 14909	D84006
<i>P. amygdali</i> ATCC 33614	Z76654
<i>P. antarctica</i> DSM 15318	AJ537601
<i>P. aurantiaca</i> ATCC 33663	DQ682655
<i>P. azotoformans</i> CCUG 12536	D84009
<i>P. brassicacearum</i> DSM 13227	AF100321
<i>P. chlororaphis</i> ATCC 9446	Z76673
<i>P. cichorii</i> ATCC 10857	Z76658
<i>P. corrugata</i> ATCC 29736	D84012
<i>P. fluorescens</i> DSM 50090	D84013
<i>P. fragi</i> ATCC 4973	AF094733
<i>P. gessardii</i> CIP 105469	AF074384
<i>P. kilonensis</i> DSM 13647	AJ292426
<i>P. libanensis</i> CCUG 43190	AF057645
<i>P. lini</i> CCUG 51522	AY035996
<i>P. luteola</i> ATCC 43273	D84002
<i>P. mandelii</i> ATCC 700871	AF058286
<i>P. marginalis</i> ATCC 10844	Z76663
<i>P. mendocina</i> ATCC 25411	D84016
<i>P. migulae</i> CCUG 43165	AF074383
<i>P. mucidolens</i> ATCC 4685	D84017
<i>P. orientalis</i> DSM 17489	AF064457
<i>P. oryzihabitans</i> ATCC 43272	D84004
<i>P. pertucinogena</i> ATCC 190	AB021380
<i>P. putida</i> ATCC 12633	D84020
<i>P. rhizosphaerae</i> CECT 5726	AY152673
<i>P. rhodesiae</i> DSM 14020	AF064459
<i>P. savastanoi</i> ATCC 13522	AB021402
<i>P. stutzeri</i> ATCC 17588	AF094748
<i>P. synxantha</i> ATCC 9890	D84025
<i>P. syringae</i> ATCC 19310	DQ318866
<i>P. tolaasii</i> ATCC 33618	AF255336
<i>P. veronii</i> ATCC 700272	AF064460

2.10.4 Untersuchungen zur ACC Deaminase

Angesichts der Eigenschaften des Abdecksubstrats (siehe Abschnitt 1.1.3) war anzunehmen, dass die bakterielle ACC Deaminase bei der Pflanzenwachstums-Förderung eine entscheidende Rolle spielen könnte. Aus diesem Grund wurde das Enzym genauer untersucht.

2.10.4.1 Ermittlung der Gensequenz

Der genetische Nachweis des Gens der ACC Deaminase (*acdS*) bei Isolat 2.2 erfolgte durch Nutzung eines PCR-Protokolls nach Kamala-Kannan et al. (2010). Dieses verwendete degenerierte Primer (ACCF und ACCr), die anhand der ACC Deaminase-Gensequenzen der Stämme *P. putida* AM15, *P. putida* UW4, *Pseudomonas* sp. AT14, *Pseudomonas* sp. CH-GRS, *Pseudomonas* sp. PNSL und *Pseudomonas* sp. FY32 konzipiert wurden. Die Reaktionen in je 25 µl enthielten 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTPs, jeweils 0,2 µM der Primer, 1 U *Taq* DNA Polymerase sowie 2 µl DNA-Template-Lösung in 1x PCR-Puffer. Als DNA-Template diente eine in 200 µl A. bidest gelöste Kolonie. Im Programm folgten nach einer initialen Denaturierung für 5 min bei 94°C 35 Zyklen mit jeweils 1 min bei den Temperaturen 94°C, 55°C und 72°C sowie die finale Elongation für 10 min bei 72°C. Das Amplikon wies eine Länge von etwa 1 kb auf und der Erfolg der PCR wurde durch Elektrophorese der PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarose-Gel in TAE-Puffer und anschließender Färbung durch Ethidiumbromid überprüft. Erfolgreich amplifizierte Teile des ACC Deaminase-Gens waren dann Grundlage für Sequenzierungen (siehe Abschnitt 2.8.10).

2.10.4.2 Massenspektrometrische Untersuchung des Enzyms

Zur massenspektrometrischen Darstellung des Enzyms ACC Deaminase erfolgten zunächst die Extraktion des Gesamtproteins von Isolat 2.2 und die Auftrennung der Proteine in der Gelelektrophorese. Dafür wurden jeweils 10 ml M9-Minimalmedium bzw. M9-Minimalmedium mit 3 mM ACC als einziger Stickstoffquelle mit etwa $5 \cdot 10^7$ CFU beimpft und bei 140 rpm und 28°C über Nacht (18 h) inkubiert. Im Anschluss folgte die Abschätzung der jeweils gewachsenen Zelldichte mittels Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Durch Verdünnung mit frischem M9-Medium ohne Stickstoff-Quelle und anschließender Messung der Extinktion geschah dann ein Abgleich der Zellzahl in beiden Ansätzen. Nach der Zentrifugation von je 10 ml der Ansätze für 15 min bei 3200 g wurden jeweils 4 ml der Überstände verworfen und die Zellpellets im restlichen Medium resuspendiert. Daraufhin folgte die Verteilung dieser Suspensionen auf jeweils drei 2,0 ml Reaktionsgefäße und die Zentrifugation bei 15000 g für 5 min. Die Überstände wurden verworfen und die Pellets in je

500 µl PBS-Puffer gelöst, die drei jeweils zusammengehörenden Suspensionen vereint und diese Ansätze als Waschschrift erneut zentrifugiert. Nach dem wiederholten Waschen der Zellen in 500 µl PBS-Puffer und der Aufnahme der Pellets in je 80 µl SDS-Ladepuffer (4x) folgte die Lagerung auf Eis. Im Anschluss an das Aufkochen der Ansätze für 10 min bei 95°C wurden diese sofort wieder auf Eis gestellt und nach kurzer Zeit pro Ansatz 5 µl auf ein 12%iges SDS-Gel zusammen mit 5 µl Prestained Protein Molecular Weight Marker aufgetragen. Nach 5 min Vorlauf bei 60 V folgten die Erhöhung der Spannung auf 100 V sowie die Gelelektrophorese für ca. 100 min. Im Anschluss entnahm man das Gel aus der Kammer, erhitzte es in A. bidest kurz in der Mikrowelle und nach dem Abkühlen für 10 min bei 50 rpm und RT schlossen sich das Entfernen des Wassers und die Übersichtung des Gels mit Coomassie-Färbelösung an. Wieder wurde bei 50 rpm und RT inkubiert und nach 2 h die Färbelösung entfernt, durch A. bidest ersetzt und das Gel über Nacht unter gleichen Bedingungen gewaschen. Am nächsten Tag erfolgten dann die Gel-Dokumentation und die Auswahl interessanter Banden, die nur im Ansatz mit ACC als einziger Stickstoffquelle vorkamen und somit auf die Anwesenheit des Enzyms ACC-Deaminase hindeuteten.

Als Grundlage für die massenspektrometrischen Untersuchungen dienten im weiteren Verlauf sowohl interessante Banden der ACC-haltigen Ansätze als auch die jeweiligen Regionen der Ansätze in normalem M9-Medium auf gleicher Laufhöhe. Dazu wurden die interessanten Banden bzw. Gelbereiche mit dem Skalpell ausgeschnitten, die einzelnen Gelstücke jeweils in Pipettenspitzen (10 µl) platziert und diese in Mikroglasröhrchen gesteckt. Mittels Zentrifugation der Ansätze für 15 min bei 16000 g und 4°C erfolgte hier die Homogenisierung der Stücke aufgrund wirkender Scherkräfte. Die Gelfragmente in den Röhrchen wurden nun mit einer Trypsin-Lösung (10 ng µl⁻¹ Trypsin in 50 mM NH₄HCO₃) überschichtet und für 1 h bei 50°C und 900 rpm im Schüttelheizblock inkubiert, worauf sich eine erneute Zentrifugation für 20 min bei 16000 g und 4°C anschloss. Dann folgte die vorsichtige Überführung des peptidhaltigen Überstands ohne Gelfragmente sowie dessen Ansäuerung mit dem gleichen Volumen einer 0,5%igen Ameisensäure.

Nach der Lagerung der Proben über Nacht bei -20°C fanden deren Auftrennung mit dem HPLC-System NanoLC-1D (Eksigent Technologies, USA) und die Analyse über den ESI Massenspektrograph 4000QTRAPTM (Applied Biosystems, U.S.A.) statt, wobei 5 µl jeder Probe untersucht wurden. Im Anschluss an einen positiven MS Full Scan (EMS) im linearen Ion-Trap-Modus (400-1400 amu) folgte ein Enhanced Resolution Scan (ER) der vier stärksten Signale des EMS Scans. Der im ER ermittelte Ladungsstatus gab die Kollisionsenergie für den darauf folgenden Enhanced Product Ion Scan (EPI, 100-1700 amu) vor. Mittels der

Software MASCOT (Matrix Science, Version 1.9.05) erfolgte der Abgleich der MS/MS Spektren mit einer Sequenzdatenbank (MSDB). Ein Probendurchlauf dauerte 80 min, wobei die Zykluszeit der MS- und MS/MS-Scans 3,7 s betrug.

2.10.5 Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Wachstumsförderung

Mithilfe einer Transposon-Mutagenese sollten Mutanten des Isolats 2.2 mit *knock-out* der ACC Deaminase-Aktivität hergestellt werden, wobei hierzu das EZ-Tn5TM <KAN-2> Tnp TransposomeTM Kit (EPICENTRE Biotechnologies, U.S.A.) diene.

Per Elektroporation wurde in die Zellen ein Transposom eingebracht, d.h. ein stabiler Komplex bestehend aus Transposon und Transposase, der sich aufgrund der Magnesium-Ionen im Zellinneren aktivierte und zufällig in das Bakteriengenom inserierte. Mittels der durch das Transposon vermittelten Kanamycin-Resistenz (Km^r) konnten zunächst die erfolgreich transformierten Zellen selektiert werden. Durch Negativ-Selektion erfolgte dann die Auswahl von Mutanten mit fehlender ACC Deaminase-Aktivität, welche daraufhin Grundlage weiterer Untersuchungen waren.

2.10.5.1 Transposon-Mutagenese des Isolats 2.2

Choi et al. (2006) folgend wurden zunächst 6 ml LB-Bouillon mit einer Kolonie des Isolats beimpft und über Nacht (ca. 18 h) bei 28°C und 140 rpm inkubiert. Nach der Aliquotierung der Kultur in viermal je 1,5 ml und der Zentrifugation bei 15000 g für 2 min folgte das Waschen der Pellets in je 1 ml 300 mM Saccharose-Lösung. Danach wurden die Pellets in insgesamt 100 µl Saccharose-Lösung vereint und hierzu 1 µl der Transposom-Lösung (20 ng DNA) gegeben, worauf die Elektroporation dieses Ansatzes in einer 0,2 cm Küvette bei 2,5 kV, 200 Ω und 25 µF im Bio-Rad Gene PulserTM (Bio-Rad Laboratories, München) folgte. Sofort im Anschluss fanden die Überführung des Ansatzes in 900 µl vorgewärmtes SOC-Medium sowie die Inkubation bei 37°C für 1 h unter leichtem Schütteln (50 rpm) statt. Dann erfolgten das Ausplattieren einer Verdünnungsreihe auf Standard-I-Nährmedium mit Kanamycin (50 µg ml⁻¹) sowie die Inkubation der Platten für 48 h bei 28°C. Von den gewachsenen Kolonien wurden 384 zufällig ausgewählt und der Reihe nach mit sterilen Zahnstochern sowohl auf Standard-I-Agarplatten mit Kanamycin, als auch in Mikrotiterplatten á 96 Vertiefungen mit je 100 µl M9-Minimalmedium überführt, das als einzige Stickstoffquelle ACC (3 mM) und zusätzlich Kanamycin enthielt. Nach Inkubation für bis zu 48 h bei 28°C erfolgte die Selektion von Mutanten, die im Minimalmedium kein oder nur stark vermindertes Wachstum anhand eingesetzter Trübung zeigten. Die Kolonien dieser

Stämme wurden daraufhin vom Vollmedium gepickt, auf frische Platten mit Kanamycin überimpft und weiter untersucht.

2.10.5.2 Bestimmung der Insertionsregion des Transposons

Mit den Primern KAN-2 FP-1 bzw. KAN-2 RP-1 des Transposom-Kits, die kurz vor den Mosaik-Enden des EZ-Tn5 <KAN>-Transposons anlagern, kann man bidirektional die *upstream* bzw. *downstream* gelegenen Genregionen des inserierten Transposons per Direkt-Sequenzierung ermitteln.

Durch Nutzung des DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, U.S.A.) erfolgte hierfür zunächst die Isolation der Gesamt-DNA der einzelnen mutierten Stämme, was mit dem Ansetzen von Übernachtskulturen der Mutanten in Standard-I-Nährmedium mit Kanamycin ($50 \mu\text{g ml}^{-1}$) bei 28°C und 140 rpm begann. Über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm wurden anschließend Aliquots der Zellkulturen mit frischem Medium auf ca. $1\text{-}2 \cdot 10^9 \text{ CFU ml}^{-1}$ eingestellt und diese Suspensionen dann nach Herstellerangaben weiter bearbeitet. Dabei fand die Behandlung mit Proteinase K für 2 h bei 56°C statt, welcher sich dann das Versetzen der Proben mit jeweils 20 μl einer RNase A-Lösung (10 mg ml^{-1}) und Inkubation für 10 min bei RT anschloss.

Die aufgereinigte DNA wurde danach mit dem Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, U.S.A.) aufkonzentriert. Mit den Primern KAN-2 FP-1 bzw. KAN-2 RP-1 erfolgte nun die Sequenzierung der chromosomalen Region, in der das Transposon inseriert hatte (siehe Abschnitt 2.8.10).

2.10.5.3 Untersuchung der Mutanten auf eingeschränkte Wachstumsförderung

Zur weiteren Untersuchung der gewählten Mutanten erfolgte einleitend die Erstellung von Wachstumskurven der Stämme mit ACC als einziger Stickstoffquelle. Hierfür inkubierte man zunächst Kulturen des Wildtypstamms 2.2 sowie der jeweiligen Mutanten (diese mit $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin im Medium) in jeweils 5 ml NI-Bouillon bei 28°C und 140 rpm über Nacht (ca. 18 h). Je 2 ml der Zellsuspensionen wurden dann für 5 min bei $15000 g$ zentrifugiert und die Pellets in je 1 ml M9-Minimalmedium ohne Stickstoffquelle gewaschen. Danach folgte die Resuspension der Pellets im gleichen Medium, wobei anhand der OD_{600} die Einstellung der Zellzahl auf etwa $5 \cdot 10^8 \text{ CFU ml}^{-1}$ statt fand. Aus diesen Inokulum-Lösungen gab man dann jeweils 200 μl in je 20 ml M9-Bouillon mit 3 mM ACC als einziger Stickstoffquelle (die Ansätze der Mutanten enthielten ebenfalls $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Kanamycin). Parallel wurden auch Kolben mit der gleichen Menge an normalem M9-Medium beimpft. Es folgte

die Inkubation bei 28°C und 140 rpm und eine tägliche Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD_{600}) über einen Zeitraum von insgesamt 4 d. Weiterhin fand die Untersuchung der Transposon-Mutanten auf die PGPR-Eigenschaften Auxin-Synthese (Abschnitt 2.8.7) sowie Siderophoren-Produktion (Abschnitt 2.8.5) mit Vergleich der Ergebnisse des Wildtyp-Stamms 2.2 statt.

Die Untersuchung der *in vitro* Auswirkung der Mutanten auf das Wachstum von *L. perenne* erfolgte ähnlich wie in Abschnitt 2.9.8 beschrieben. Von Isolat 2.2 sowie jedem der mutierten Stämme wurde eine Kolonie in je 5 ml Standard-I-Nährmedium (teilweise mit Kanamycin) eingerührt und über Nacht (ca. 18 h) bei 140 rpm und 28°C inkubiert. Es folgte die Zentrifugation von 2 ml je Ansatz für 5 min bei 15000 g und die Resuspension der Pellets in 0,1% Natriumpyrophosphat. Nach dem erneuten Zentrifugieren wurde im gleichen Puffer resuspendiert und hierbei jede der Zellsuspensionen auf eine OD_{600} von 1,0 eingestellt. Daraufhin versetzte man steriles *A. bidest* mit den Zellsuspensionen, um Lösungen mit ca. 10^7 CFU ml⁻¹ zu erhalten. Nun wurden jeweils 5 ml der Suspensionen in Petrischalen gegeben, in die dann zuerst ein steriles Filterpapier sowie pro Schale fünf sterile Samen von *L. perenne* platziert wurden. Es folgte eine Inkubation für 10 d in einer Gewächskammer bei 20 bis 25°C und täglicher 14stündiger Helligkeit (ca. $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) sowie die anschließende Messung der Spross- und Wurzellänge der Pflanzenkeimlinge.

2.11 Statistische Auswertung der Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse aus Bakterienkultur-, *in vitro* Pflanzen- sowie Gewächshausversuchen erfolgte als Mittelwert \pm Standardabweichung unter Angabe der Probenzahl *n* (bei Gewächshausversuchen die Anzahl der Töpfe pro Variante).

Zur statistischen Auswertung und Ermittlung der Signifikanz der Ergebnisse wurde die Software GraphPad Prism (Version 5.00) genutzt, wobei je nach Experiment ein ungepaarter t-Test oder Dunnett's one way ANOVA (analysis of variance) Anwendung fand. Hierbei wurden alle Varianten nur mit der jeweils unbeimpften Kontrolle und nicht untereinander verglichen.

3. Ergebnisse

3.1 Erste Probenahme

Im Rahmen der ersten *in situ*-Probenahme erfolgte von den NBRIP-Platten, auf denen die Suspensionen der Weidelgraswurzeln ausplattiert wurden, im Laufe von 10 d die Isolation von insgesamt 18 Kolonien mit aufgeklärtem Hof. Diese Bakterienstämme mit der Bezeichnung 1.1 bis 1.18 wurden erneut auf NBRIP-Platten ausgestrichen und zeigten auch hierauf wieder Anzeichen von Phosphatsolubilisierung (ohne Abbildung). Nach einer weiteren Überimpfung auf Standard-I-Nährmedium folgte die exemplarische Bestimmung der Solubilisierungsleistung der Rhizosphärenisolate im Flüssigmedium (siehe Abb. 7).

Bei fast allen der Stämme konnte nach einer Woche in NBRIP-Bouillon eine hohe Konzentration an gelöstem Phosphat im Medium nachgewiesen werden, die zwischen $303 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 1.6) und $678 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 1.12) lag. Lediglich Isolat 1.18 löste verhältnismäßig wenig Phosphat ($77 \mu\text{g ml}^{-1}$) und bei Isolat 1.14 konnte mit $2 \mu\text{g ml}^{-1}$ nach einer Woche fast gar keine Solubilisierung nachgewiesen werden. In Hinblick auf die Düngeproblematik bei der Haldenbegrünung wurden die Isolate 1.14 und 1.18 aufgrund ihres mangelnden Vermögens zur Phosphatsolubilisierung von den weiteren Untersuchungen ausgeschlossen.

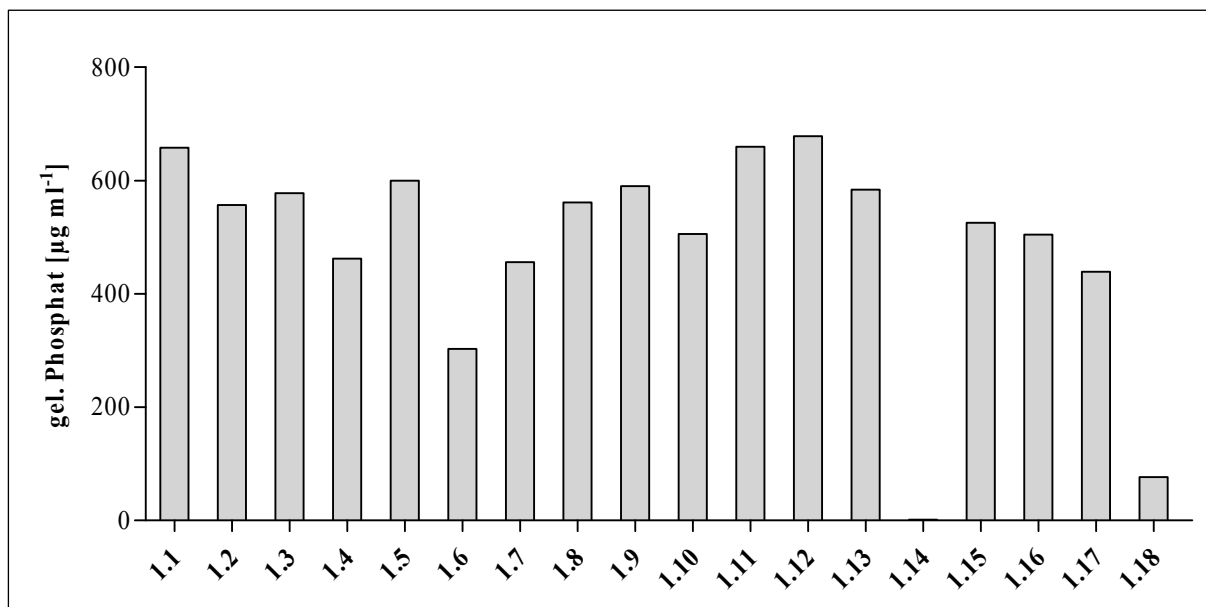


Abb. 7: Phosphatsolubilisierungs-Leistung der Isolate der ersten Probenahme

Dargestellt ist die Konzentration des von den Isolaten 1.1 bis 1.18 aus NBRIP-Bouillon gelösten Phosphats. Hierfür wurde eine Kolonie in 10 ml Medium gerührt, für 7 d bei 28°C und 180 rpm inkubiert und der gelöste Phosphatgehalt nach DIN EN 1189 : 1996 bestimmt ($n=1$).

Die übrigen 16 Isolate zeigten nach 24 h auf CAS-Agar eine deutliche Entfärbung des Mediums, die auf die Produktion von Siderophoren hinweist. Einzig das Isolat 1.8 war jedoch dazu in der Lage, in M9-Minimalmedium mit 3 mM ACC als einziger Stickstoffquelle zu wachsen, was auf das Vorhandensein des Enzyms ACC Deaminase hindeutet.

3.2 Zweite Probenahme

Aus den Wurzelsuspensionen der zweiten Probenahme konnten zahlreiche Bakterienkolonien angezogen werden, die auf den NBRIP-Platten einen mehr oder weniger stark aufgeklärten Hof aufwiesen. Von diesen Isolaten wurden 26 auf neue NBRIP-Platten überimpft und auch hier zeigten alle Stämme die Fähigkeit zur Solubilisierung. Nach dem Überimpfen auf Standard-I-Nährmedium zur weiteren Arbeit wiesen jedoch die Isolate 2.13, 2.15, 2.17, 2.24, 2.25 und 2.26 auch nach 5 d kein oder nur stark vermindertes Wachstum auf, weswegen diese Stämme nicht weiter untersucht wurden.

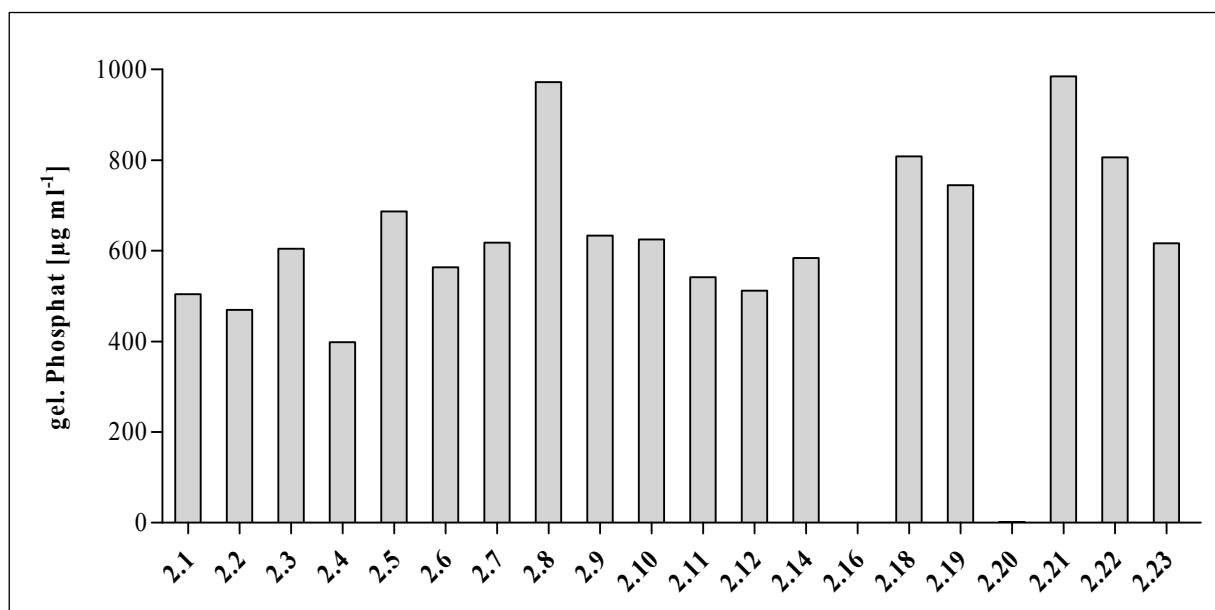


Abb. 8: Phosphatsolubilisierungs-Leistung der Isolate der zweiten Probenahme

Dargestellt ist die Konzentration des von den Isolaten 2.1 bis 2.23 aus NBRIP-Bouillon gelösten Phosphats. Hierfür wurde eine Kolonie in 10 ml Medium gerührt, für 7 d bei 28°C und 180 rpm inkubiert und der gelöste Phosphatgehalt nach DIN EN 1189 : 1996 bestimmt (n=1).

Nach Inkubation für eine Woche konnten die meisten Isolate der zweiten Probenahme Phosphat aus NBRIP-Bouillon in Lösung bringen (siehe Abb. 8), wobei hier die Spanne von 398 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 2.4) bis 984 $\mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 2.21) reichte. Die Isolate 2.16 und 2.20 solubilisierten jeweils nur 1-2 $\mu\text{g ml}^{-1}$ Phosphat, weshalb beide für die spätere Anwendung uninteressant waren und nicht weiter untersucht wurden.

Die übrigen Stämme wiesen alle nach 24 h Inkubation auf CAS-Agar eine Siderophoren-Produktion auf und sieben davon waren darüber hinaus in der Lage, als einzige Stickstoffquelle ACC zu nutzen. Dies waren die Isolate 2.2, 2.5, 2.8, 2.18, 2.19, 2.22 und 2.23.

3.3 Auswahl und weitere Untersuchung geeigneter Isolate

Von den insgesamt 34 phosphatsolubilisierenden und siderophorenproduzierenden Isolaten der beiden Probenahmen wiesen acht die Fähigkeit auf, in Minimalmedium mit ACC als einziger Stickstoffquelle zu wachsen, was auf ACC Deaminase-Aktivität hindeutet. Angesichts des bei der Abdeckung der Halde Sigmundshall genutzten technologischen Substrats mit seinem anfangs hohen Salzgehalt, dem hohen pH-Wert und den verschiedenen Schwermetallen wurden diese acht Rhizosphärenisolate für die weiteren Arbeiten ausgewählt, da sie neben der Bereitstellung von Nährstoffen auch möglicherweise die Auswirkungen dieser verschiedenen Stressfaktoren auf die Pflanzen vermindern könnten.

3.3.1 Charakterisierung interessanter Isolate

Alle acht Isolate waren Gram-negativ, zeigten sich in 1000facher Vergrößerung als motile Stäbchen und wiesen neben einer Katalase-Aktivität auch auf Pseudomonas F-Agar eine deutliche Fluoreszenz unter Bestrahlung mit UV-Licht auf. Eine genetische Analyse des Verwandtschaftsgrades der Stämme mittels einer rep-PCR zeigte teilweise hohe Übereinstimmungen im Bandenmuster (siehe Abb. 9).

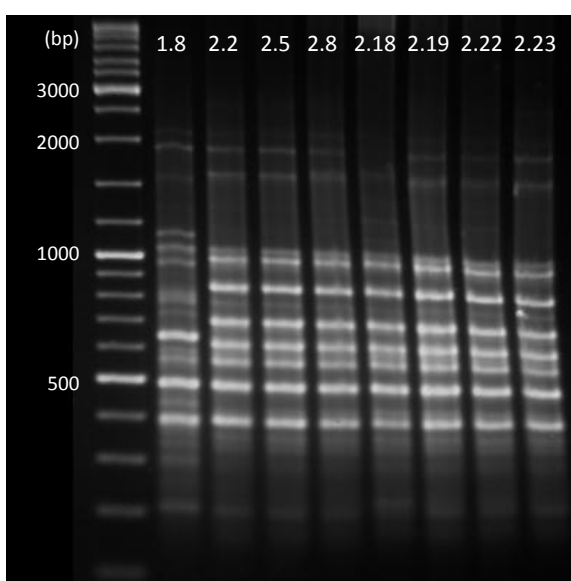


Abb. 9: *Fingerprint*-PCR der acht Isolate mit ACC Deaminase-Aktivität

Dargestellt sind die ERIC-PCR-Produkte der acht Isolate (1.8 bis 2.23) auf einem 1,5%igen Agarose-Gel zusammen mit dem Marker GeneRuler DNA Ladder Mix (links, mit Angabe der Laufhöhen in bp). Das Bandenmuster des Isolats 1.8 unterscheidet sich deutlich von denen der übrigen Isolate (2.2 bis 2.23).

Insgesamt schienen zwei verschiedene Bandenmuster vorzuliegen, wobei sich das Isolat 1.8 der ersten Probenahme eindeutig von den anderen Stämmen (2.2 bis 2.23) unterschied. Die Isolate der zweiten Probenahme wiesen untereinander kaum Abweichungen in den *fingerprint*-Mustern auf. Um den weiteren Arbeitsaufwand gerade in Hinsicht auf die Gewächshausversuche zu verringern, wurden neben dem Isolat 1.8 nur die ersten drei Stämme der zweiten Probenahme (2.2, 2.5 und 2.8) weiter untersucht.

Nachdem das Enzym Cytochrom-c-Oxidase bei den vier Isolaten nachgewiesen wurde, erfolgte die Identifizierung der Stämme mit dem Schnelltestsystem API 20 NE. Der Test wies nach verlängerter Inkubationszeit alle Isolate mit einer Wahrscheinlichkeit von 99,9% der Spezies *Pseudomonas fluorescens* zu, wobei das Testergebnis des Isolats 1.8 eine Testgüte $T = 0,77$ aufwies, die anderen Isolate 2.2, 2.5 und 2.8 hingegen einen Wert von $T = 0,66$ (Einzelergebnisse siehe Anhang, Tab. 23).

In der spezifischen PCR für den Genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) lieferten alle vier Isolate ein Amplikon mit einer Länge von etwa 990 bp, welches nach dem Verdau mit dem Restriktionsenzym *HaeIII* ein *Pseudomonas*-spezifisches Bandenmuster zeigte (ohne Abbildung). Da die hierfür genutzte PCR einen Teil der 16S rDNA amplifiziert, wurden diese PCR-Produkte ebenfalls sequenziert. Von Isolat 1.8 konnten 792 bp der Gen-Sequenz ermittelt werden, von Isolat 2.2 798 bp, von Isolat 2.5 789 bp und von Isolat 2.8 insgesamt 802 bp, wobei zwischen den Sequenzen eine nahezu komplette Homologie bestand: bei Isolat 1.8 lag an einer Position ein deutliches Adenin (A) vor, bei den anderen Stämmen hingegen die sich überlagernden Basen Guanin (G) und Adenin (als "R" zusammengefasst). Ein Datenbank-Abgleich zeigte eine über 99%ige Übereinstimmung der Basenabfolgen mit diversen *Pseudomonas*-Stämmen, bei denen teilweise als Spezies *Pseudomonas fluorescens* angegeben wurde, vereinzelt aber auch andere Spezies wie *P. corrugata*, *P. brassicacearum*, *P. aurantiaca* und *P. kilonensis* (siehe Anhang, Tab. 22).

3.3.2 Untersuchung auf PGPR-Eigenschaften

Die vier interessanten Isolate wiesen alle ein ähnliches Vermögen auf, Tricalciumphosphat aus unterschiedlich stark gepuffertem NBRIP-Flüssigmedium zu lösen (siehe Abb. 10). In ungepuffertem NBRIP konnte das Isolat 1.8 $471 \pm 30 \mu\text{g ml}^{-1}$ in Lösung bringen, Isolat 2.2 löste $430 \pm 21 \mu\text{g ml}^{-1}$ Phosphat, Isolat 2.5 $454 \pm 63 \mu\text{g ml}^{-1}$ und das Isolat 2.8 solubilisierete $484 \pm 58 \mu\text{g ml}^{-1}$ Orthophosphat. Eine Pufferung des Mediums mit 50 mM Tris HCl und die Erhöhung des pH-Werts auf 8,0 beeinflusste die Solubilisierungs-Leistung kaum, hier löste Isolat 1.8 $484 \pm 23 \mu\text{g ml}^{-1}$ Phosphat, Isolat 2.2 löste $476 \pm 23 \mu\text{g ml}^{-1}$, das Isolat 2.5

vermochte $472 \pm 10 \mu\text{g ml}^{-1}$ zu lösen und Isolat 2.8 $467 \pm 14 \mu\text{g ml}^{-1}$. Lediglich die weitere Erhöhung der Pufferung auf insgesamt 100 mM Tris HCl halbierte in etwa die Menge des gelösten Phosphats, aber auch hier waren die gemessenen Orthophosphatgehalte sehr ähnlich. Das Isolat 1.8 der ersten Probenahme löste $216 \pm 41 \mu\text{g ml}^{-1}$ Phosphat, Isolat 2.2 brachte $214 \pm 47 \mu\text{g ml}^{-1}$ in Lösung, Isolat 2.5 $207 \pm 32 \mu\text{g ml}^{-1}$ und Isolat 2.8 löste $215 \pm 29 \mu\text{g ml}^{-1}$.

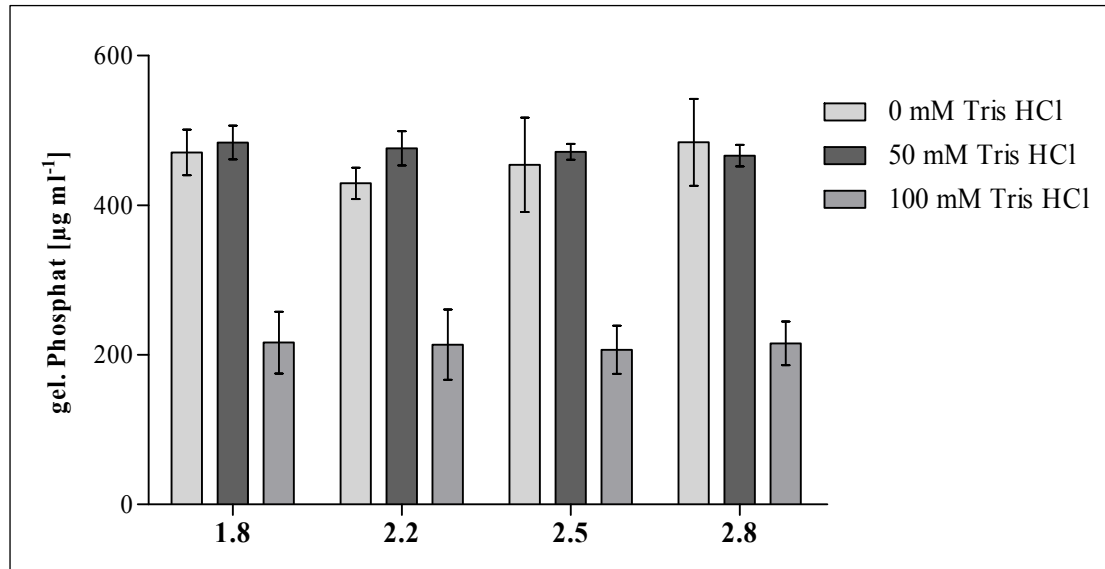


Abb. 10: Phosphatsolubilisierungs-Leistung der Isolate unter verschiedenen Pufferungen

Dargestellt ist die Konzentration des Phosphats, das von den Isolaten 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8 aus unterschiedlich stark gepufferter NBRIP-Bouillon gelöst wurde. Hierfür wurden 20 ml Medium mit 10^8 CFU inokuliert, für 7 d bei 28°C und 180 rpm inkubiert und der gelöste Phosphatgehalt nach DIN EN 1189 : 1996 bestimmt (n=3).

Alle vier Isolate waren dazu in der Lage, in M9-Minimalmedium aus zugesetztem L-Tryptophan Auxine zu synthetisieren, was durch Zugabe von Salkowski-Reagenz nachgewiesen wurde (siehe Abb. 11). Pro Extinktionseinheit bei 600 nm produzierte Isolat 1.8 $7,60 \pm 0,66 \mu\text{g ml}^{-1}$ Auxin, das Isolat 2.2 bildete $5,41 \pm 0,71 \mu\text{g ml}^{-1}$, Isolat 2.5 synthetisierte $5,11 \pm 0,24 \mu\text{g ml}^{-1}$ der Phytohormone und das Isolat 2.8 $5,59 \pm 0,59 \mu\text{g ml}^{-1}$.

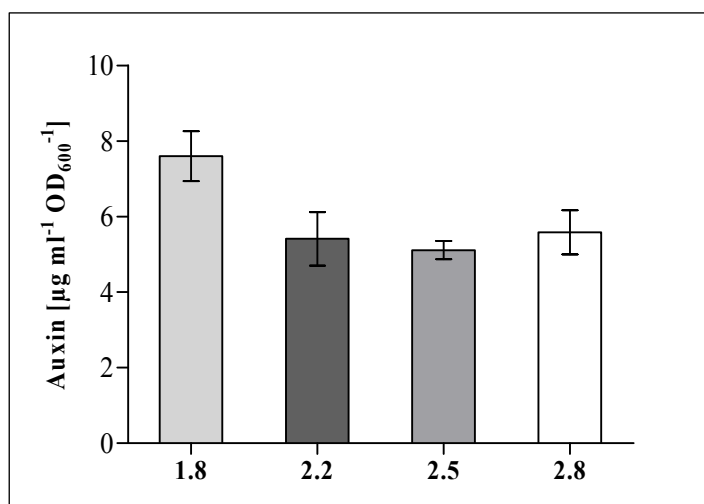


Abb. 11: Auxin-Synthese der Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8

Dargestellt ist die von den Isolaten synthetisierte Menge an Auxin (normalisiert auf die Zelldichte). Hierfür wurden 20 ml M9-Minimalmedium (mit 1 mM L-Tryptophan) mit 10^8 CFU inokuliert und bei 140 rpm und 28°C für 48 h inkubiert. Der Auxin-Nachweis erfolgte über Anfärbung des zellfreien Überstands mit Salkowski-Reagenz (n=3).

3.4 Erster Gewächshausversuch mit den Isolaten 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8

Im ersten Gewächshausexperiment sollte untersucht werden, welchen Einfluss die vier Rhizosphärenisolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8 auf das Wachstum von der zur Haldenrekultivierung genutzten Pionierpflanze Deutsches Weidelgras (*Lolium perenne*) haben. Das Gras wurde auf entsalztem REKAL/SAV angezogen, um die Gegebenheiten auf der Rückstandshalde Sigmundshall zu simulieren. Die Analyse des eingesetzten Substrats ergab einen pH-Wert von $8,00 \pm 0,06$, eine elektrische Leitfähigkeit von $3,35 \pm 0,09 \text{ mS cm}^{-1}$ sowie einen Trockensubstanzanteil von $83,7 \pm 0,2\%$. Pro 100 g dieser Trockensubstanz lagen $98,6 \pm 5,6 \text{ mg}$ Phosphor, $208,7 \pm 11,4 \text{ mg}$ Kalium, $536,5 \pm 10,0 \text{ mg}$ Magnesium und $43,8 \pm 0,5 \text{ mg Cl}$ vor, woraus sich ein NaCl-Gehalt von $0,072 \pm 0,001\%$ errechnen lässt. Der Stickstoffgehalt der Trockenmasse lag bei $0,170 \pm 0,008\%$. Die Variante 1.A diente als ungedüngte Kontrolle, die restlichen Varianten wurden mit Stickstoff-, Phosphor- und Kaliumdünger behandelt. Hierbei stellte Variante 1.B die gedüngte Kontrolle dar, mit der die vier zusätzlich inokulierten Varianten (1.C mit Isolat 1.8, 1.D mit Isolat 2.2, 1.E mit Isolat 2.5 sowie 1.F mit Isolat 2.8) verglichen werden sollten. Inokuliert wurden die Grassamen bei der Aussaat mit 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen, wobei die Kugeln eine Zellzahl von etwa $2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$ aufwiesen. Die Erträge der einzelnen Varianten in Form der nach 100 d geernteten oberirdischen Biomasse sind in Abb. 12 und Abb. 13 dargestellt. Die Biomassen des zweiten Schnitts nach 133 d waren im ähnlichen Verhältnis zueinander wie die des ersten und sind hier nicht dargestellt.

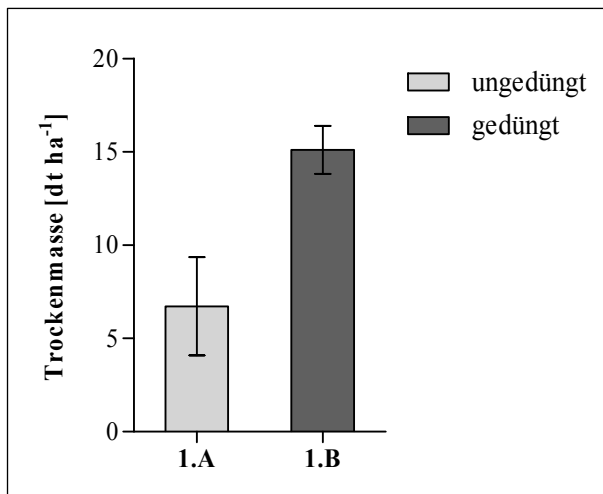


Abb. 12: Auswirkung der Düngung auf das Wachstum von *L. perenne*
Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der für 100 d auf REKAL/SAV angezogenen Gräser (n=5). Gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach einem Monat ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger.

Im Vergleich zur gedüngten Kontrollvariante (1.B) mit einer durchschnittlichen oberirdischen Trockenmasse von $15,10 \pm 1,28 \text{ dt ha}^{-1}$ zeigten die ungedüngten Pflanzen (1.A) ein deutlich ($p < 0,001$) vermindertes Wachstum ($6,72 \pm 2,63 \text{ dt ha}^{-1}$) und erreichten nur etwa 45% der durch Düngemaßnahmen erreichbaren Biomasse (siehe Abb. 12).

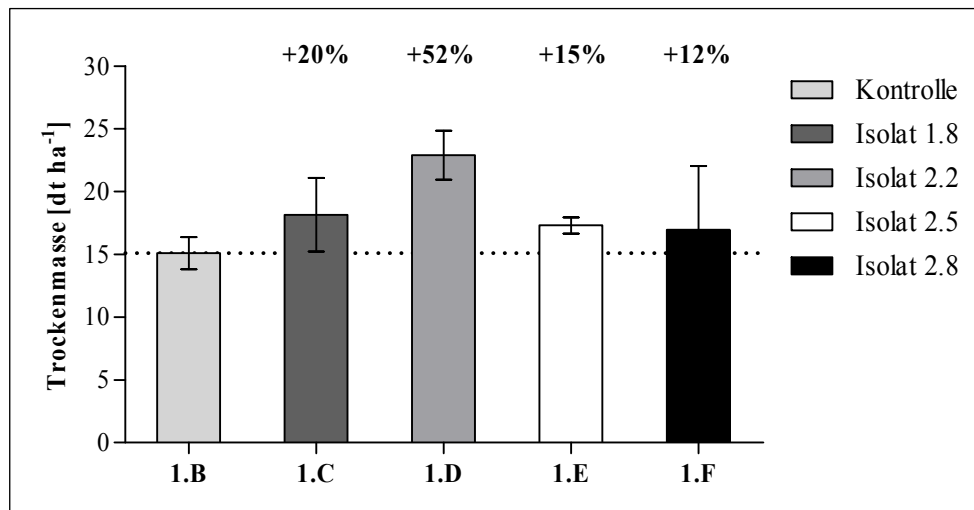


Abb. 13: Auswirkung der Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8 auf das Wachstum von *L. perenne*

Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der für 100 d auf REKAL/SAV angezogenen Gräser (n=5). Ertragssteigerungen (in %) beziehen sich auf die unbeimpfte Kontrolle (1.B, gestrichelte Linie). Inokuliert wurde mit 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen, wobei die Kugeln etwa $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹ aufwiesen. Gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach einem Monat ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger.

Verglichen mit dem gedüngten Kontrollansatz (1.B) erhöhte die zusätzliche Alginat-Inokulation mit den vier Isolaten in allen Fällen die durchschnittliche Trockenmasse (siehe Abb. 13), jedoch ist nur in Variante 1.D mit dem Isolat 2.2 eine signifikante Erhöhung ($p < 0,001$) um etwa 52% auf $22,90 \pm 1,96$ dt ha⁻¹ zu sehen. Das Isolat 1.8 erhöhte den Ertrag um ca. 20% auf $18,16 \pm 2,93$ dt ha⁻¹ (1.C), Isolat 2.5 um ca. 15% auf $17,30 \pm 0,64$ dt ha⁻¹ (1.E) und das Isolat 2.8 sorgte mit $16,96 \pm 5,08$ dt ha⁻¹ für etwa 12% mehr Trockenmasse (1.F). Für diese drei Bakterienstämme lagen allerdings keine signifikanten Ergebnisse vor ($p > 0,05$). Die Nährstoff-Analyse der oberirdischen Trockenmasse ist in Tab. 9 dargestellt.

Tab. 9: Nährstoffgehalte der oberirdischen Trockenmasse (erster Gewächshausversuch)

Variante	Stickstoff [%]	Phosphor [mg 100 g ⁻¹]	Kalium [mg 100 g ⁻¹]	Magnesium [mg 100 g ⁻¹]
1.A	3,94 ± 0,11	152,5 ± 29,6	3730,3 ± 583,3	492,8 ± 91,1
1.B	3,60 ± 0,03	156,9 ± 11,8	3647,7 ± 119,2	472,3 ± 50,0
1.C	3,48 ± 0,12	165,5 ± 27,8	3926,7 ± 447,6	539,9 ± 63,8
1.D	3,58 ± 0,08	161,3 ± 11,1	4182,1 ± 147,6	571,4 ± 20,8
1.E	3,52 ± 0,19	156,0 ± 21,7	4069,9 ± 643,8	551,0 ± 86,5
1.F	3,29 ± 0,30	142,9 ± 9,4	3616,8 ± 486,9	477,3 ± 94,4

3.6 Zweiter Gewächshausversuch mit Isolat 2.2

Im zweiten Gewächshausexperiment wurde der Einfluss des Isolats 2.2 auf das Wachstum von *L. perenne* unter verschiedenen Bedingungen weiter untersucht. Zunächst wurden auf Abdecksubstrat unterschiedliche Inokulationsbedingungen verglichen. Das entsalzte REKAL/SAV hatte einen pH-Wert von $8,11 \pm 0,02$, eine elektrische Leitfähigkeit von $3,71 \pm 0,19 \text{ mS cm}^{-1}$ und der Trockensubstanzanteil lag bei $79,2 \pm 5,5\%$. Die Trockensubstanz wies einen Stickstoff-Gehalt von $0,181 \pm 0,020\%$ auf und pro 100 g Substanz lagen $97,6 \pm 1,7 \text{ mg}$ Phosphor, $124,1 \pm 3,9 \text{ mg}$ Kalium, $641,1 \pm 18,9 \text{ mg}$ Magnesium und $22,3 \pm 0,8 \text{ mg}$ Chlor vor. Hieraus ließ sich wiederum ein NaCl-Gehalt von $0,035 \pm 0,005\%$ errechnen. Die meisten zur Inokulation genutzten Alginat-Kugeln wiesen eine Zellzahl von etwa $2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$ auf, lediglich die des Ansatzes 2.I beherbergten ca. $8 \cdot 10^7 \text{ CFU g}^{-1}$.

Die erste Ernte der oberirdischen Biomasse erfolgte nach 105 d, und zwecks Nachbeimpfung wurden die Varianten 2.A (Töpfe 1 bis 10) und 2.B (Töpfe 11 bis 20) anhand der ermittelten Frischmasse-Daten (siehe Anhang, Tab. 25) aufgeteilt: Die Töpfe 2, 4, 6, 7 und 8 mit einer Frischmasse von $28,6 \pm 5,9 \text{ g}$ bildeten die Untervariante 2.A1 und die Töpfe 1, 3, 5, 9 und 10 mit $29,5 \pm 5,7 \text{ g}$ wurden als 2.A2 zusammengefasst. Entsprechend erfolgte die Aufteilung der Variante 2.B in die Untervarianten 2.B1 (Töpfe 11, 12, 13, 14 und 20 mit $31,0 \pm 4,1 \text{ g}$ Frischmasse) und 2.B2 (Töpfe 15, 16, 17, 18 und 19 mit durchschnittlichen $31,0 \pm 4,7 \text{ g}$).

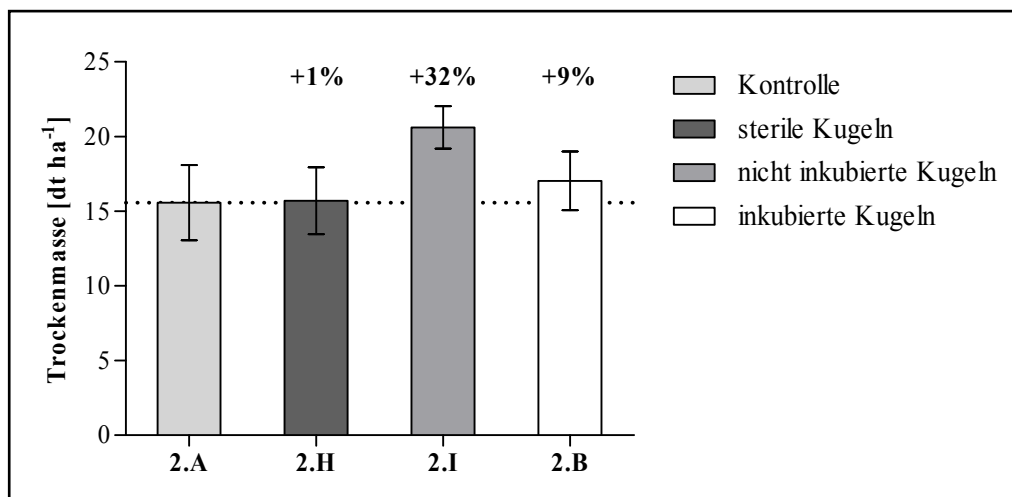


Abb. 14: Auswirkung verschiedenartiger Alginat-Kugeln auf das Wachstum von *L. perenne*
 Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der für 105 d auf REKAL/SAV angezogenen Gräser ($n \geq 5$). Ertragssteigerungen (in %) beziehen sich auf die unbeimpfte Kontrolle (2.A, gestrichelte Linie). Inokuliert wurde mit Isolat 2.2 in 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen, wobei die nicht inkubierten Kugeln etwa $8 \cdot 10^7 \text{ CFU g}^{-1}$ und die inkubierten ca. $2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$ aufwiesen. Gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach ein und zwei Monaten je ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger.

Der Effekt verschiedener Arten von Alginat-Kugeln auf das Wachstum der Pionierpflanze *L. perenne* ist in Abb. 14 zusammengefasst. Verglichen mit der unbeimpften Kontrolle (2.A) mit einer oberirdischen Trockenmasse von $15,57 \pm 2,52 \text{ dt ha}^{-1}$ wiesen die Pflanzen, die mit sterilen Alginat-Kugeln behandelt wurden (2.H), eine durchschnittliche Biomasse von $15,70 \pm 2,25 \text{ dt ha}^{-1}$ auf ($p > 0,05$). Alginat-Kugeln des Isolats 2.2, die nach der Polymerisation nicht noch einmal für 24 h in frischem Medium inkubiert wurden und somit nur etwa $8 \cdot 10^7 \text{ CFU g}^{-1}$ enthielten (2.I), erhöhten die Trockenmasse um etwa 32% auf $20,61 \pm 1,41 \text{ dt ha}^{-1}$ ($p < 0,001$). Eine weitere Inkubation der Alginat-Kugeln steigerte die Zellzahl pro Gramm auf ca. $2 \cdot 10^9 \text{ CFU}$, die Inokulation der Weidelgräser mit diesen Kugeln (2.B) erhöhte die oberirdische Biomasse jedoch nur um ungefähr 9% auf $17,03 \pm 1,96 \text{ dt ha}^{-1}$ ($p > 0,05$).

Der Einfluss der Menge an Alginat-Kugeln auf das Wachstum der Pflanzen ist in Abb. 15 dargestellt. Im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle (2.A) mit durchschnittlichen $15,57 \pm 2,52 \text{ dt ha}^{-1}$ oberirdischer Trockenmasse erhöhte die Applikation von 5 g Kugeln pro Gramm Grassamen (2.E) die Biomasse um etwa 49% auf $23,26 \pm 2,04 \text{ dt ha}^{-1}$ ($p < 0,001$). Die doppelte Menge an Kugeln (10 g pro g Samen) verursachte eine Ertragssteigerung von 9% mit einer Trockenmasse von $17,03 \pm 1,96 \text{ dt ha}^{-1}$ ($p > 0,05$). Eine Inokulation mit 15 g (2.F) bzw. 20 g Kugeln pro Gramm Samen (2.G) lieferte 25% ($19,40 \pm 3,10 \text{ dt ha}^{-1}$ mit $p > 0,05$) bzw. 41% ($21,95 \pm 4,76 \text{ dt ha}^{-1}$) mehr oberirdische Biomasse. Letztere Biomasseerhöhung war signifikant ($p < 0,001$).

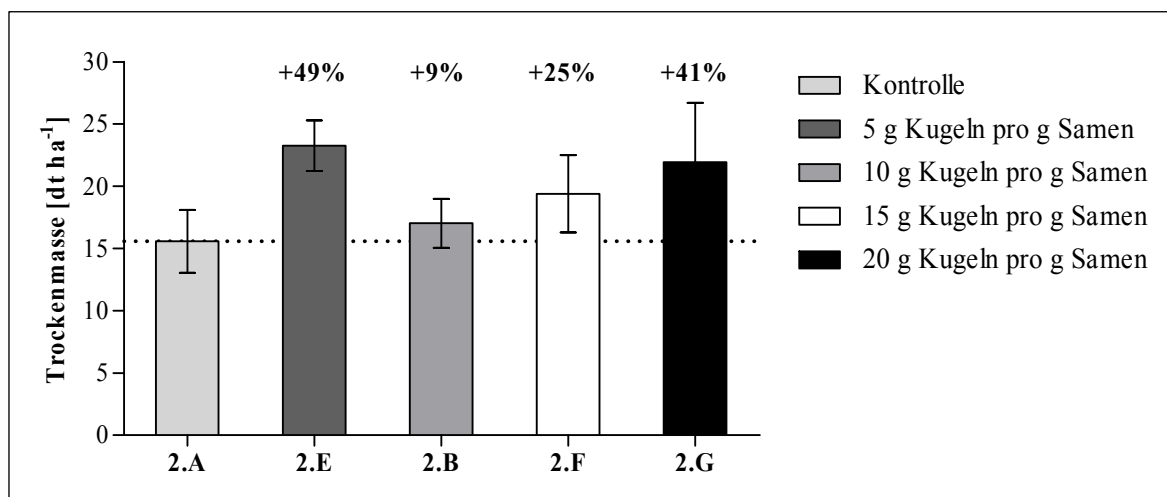


Abb. 15: Auswirkung der Menge an Alginat-Kugeln auf das Wachstum von *L. perenne*

Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der für 105 d auf REKAL/SAV angezogenen Gräser ($n \geq 5$). Ertragssteigerungen (in %) beziehen sich auf die unbeimpfte Kontrolle (2.A, gestrichelte Linie). Inokuliert wurde mit Isolat 2.2 in verschiedenen Mengen Kugeln pro g Samen, wobei die Kugeln etwa $2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$ aufwiesen. Gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach ein und zwei Monaten je ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger.

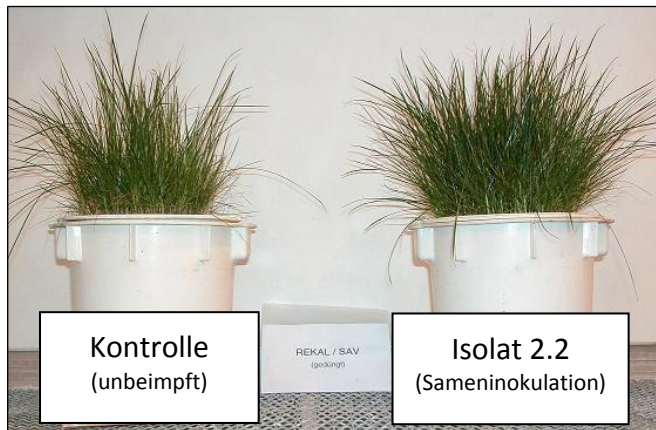


Abb. 16: Förderung des Wachstums von *Lolium perenne* durch Isolat 2.2

Vergleich von unbeimpfter Kontrolle (2.A, links) und Ansatz mit inokulierten Samen (2.J, rechts) nach 105 d. Ausgesät wurden je 1,2 g Samen in Töpfen mit REKAL/SAV als Substrat, gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach ein und zwei Monaten je ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger. Die Inokulation bewirkte eine durchschnittliche Erhöhung der oberirdischen Trockenmasse um über 60%.

Nach der Inokulation der Weidelgrassamen mithilfe des Haftmittels Methylcellulose konnten ungefähr $2 \cdot 10^9$ lebende Zellen pro g Samen nachgewiesen werden. Die Beimpfung der untersuchten Pflanzen durch Nutzung dieser inokulierten Samen (2.J) verursachte im Vergleich zu unbeimpften Kontrolle (2.A) eine signifikante 62%ige Ertragssteigerung ($p < 0,01$) von $15,57 \pm 2,52$ dt auf $25,24 \pm 7,21$ dt pro Hektar (siehe Abb. 16 und Abb. 17). Die Analysedaten der oberirdischen Trockenmasse des ersten Schnitts ist in Tab. 10 dargestellt.

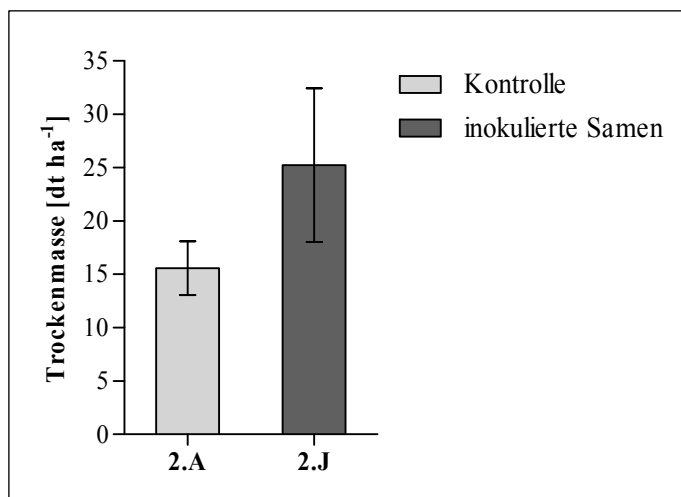


Abb. 17: Auswirkung einer Sameninokulation auf das Wachstum von *L. perenne*

Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der für 105 d auf REKAL/SAV angezogenen Gräser ($n \geq 5$). Ausgesät wurden sowohl sterile als auch mit Isolat 2.2 in Methylcellulose inokulierte Samen (ca. $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹). Gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach ein und zwei Monaten je ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger.

Eine weitere Beimpfung der Ansätze 2.A2 und 2.B2 durch Isolat 2.2 in Alginat-Kugeln nach 105 d brachte bei der zweiten Ernte nach insgesamt 140 d keine Änderungen im Wuchs (siehe Abb. 18). Die komplett ohne Bakterien behandelte Variante 2.A1 wies im zweiten Schnitt ca. 23% mehr Trockenmasse auf und steigerte den Ertrag von $15,71 \pm 2,61$ auf $19,39 \pm 5,00$ dt ha⁻¹. Die nach 105 d das erste Mal inokulierte Variante 2.A2 steigerte die Biomasse von $15,44 \pm 2,73$ um etwa 24% auf $19,16 \pm 2,12$ dt ha⁻¹. Die einmalig bei der Aussaat beimpfte Variante 2.B1 zeigte im Vergleich zum ersten Schnitt mit

$16,81 \pm 2,13 \text{ dt ha}^{-1}$ nach 35 d eine um 32% auf $22,18 \pm 2,52 \text{ dt ha}^{-1}$ gesteigerte oberirdische Trockenmasse, und die insgesamt zweimal mit dem Isolat 2.2 behandelte Variante 2.B2 brachte nur eine 15%ige Erhöhung der Biomasse von $17,24 \pm 2,00 \text{ dt ha}^{-1}$ auf $19,84 \pm 3,74 \text{ dt ha}^{-1}$.

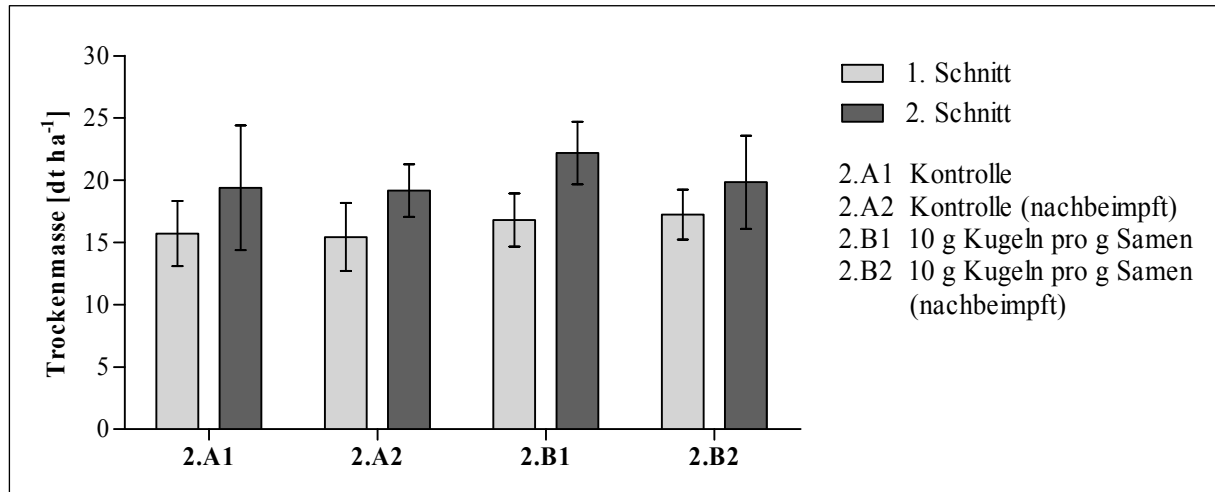


Abb. 18: Auswirkung einer zweiten Inokulation auf das Wachstum von *L. perenne*

Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der auf REKAL/SAV angezogenen Gräser nach 105 d (1. Schnitt) und nach 140 d (2. Schnitt) (n=5). Inokuliert wurde mit Isolat 2.2 teilweise bei Aussaat (2.B1 und 2.B2) und nach 105 d (2.A2 und 2.B2) mit jeweils 10 g pro g Samen, wobei die Kugeln etwa $2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$ aufwiesen. Gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach ein und zwei Monaten je ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger.

Tab. 10: Nährstoffgehalte der oberirdischen Trockenmasse (zweiter Gewächshausversuch)

Variante	Stickstoff [%]	Phosphor [mg 100 g ⁻¹]
2.A	$3,63 \pm 0,16$	$163,1 \pm 15,8$
2.B	$3,67 \pm 0,07$	$166,7 \pm 4,9$
2.C	$3,88 \pm 0,08$	$218,6 \pm 12,1$
2.D	$3,93 \pm 0,05$	$222,9 \pm 4,8$
2.E	$3,59 \pm 0,10$	$167,5 \pm 13,4$
2.F	$3,39 \pm 0,09$	$150,8 \pm 8,9$
2.G	$3,39 \pm 0,12$	$156,5 \pm 9,5$
2.H	$3,57 \pm 0,09$	$160,8 \pm 6,0$
2.I	$3,37 \pm 0,17$	$155,9 \pm 12,6$
2.J	$3,20 \pm 0,19$	$144,3 \pm 11,8$
2.K	$1,25 \pm 0,07$	$275,9 \pm 18,3$
2.L	$1,21 \pm 0,02$	$271,5 \pm 10,8$

Die Wurzeln der unbeimpften Kontrolle (2.A1) wiesen eine Trockenmasse von durchschnittlich $28,27 \pm 6,43 \text{ dt ha}^{-1}$ auf, die nach 105 d mit frischen Alginat-Kugeln des Isolats 2.2 nachbeimpfte Kontrolle (2.A2) zeigte mit $27,54 \pm 5,70 \text{ dt ha}^{-1}$ eine um 3% verringerte Masse (siehe Abb. 19). Die bei Aussaat mit 5 g Kugeln pro Gramm Grassamen inokulierten Pflanzen hatten eine um 24% erhöhte Wurzelmasse von $35,14 \pm 4,25 \text{ dt ha}^{-1}$, und die durch Sameninokulation beimpften Weidelgräser wiesen eine unterirdische getrocknete Biomasse von $42,78 \pm 7,62 \text{ dt ha}^{-1}$ auf, wobei diese 51%ige Erhöhung als einzige signifikant war ($p < 0,01$).

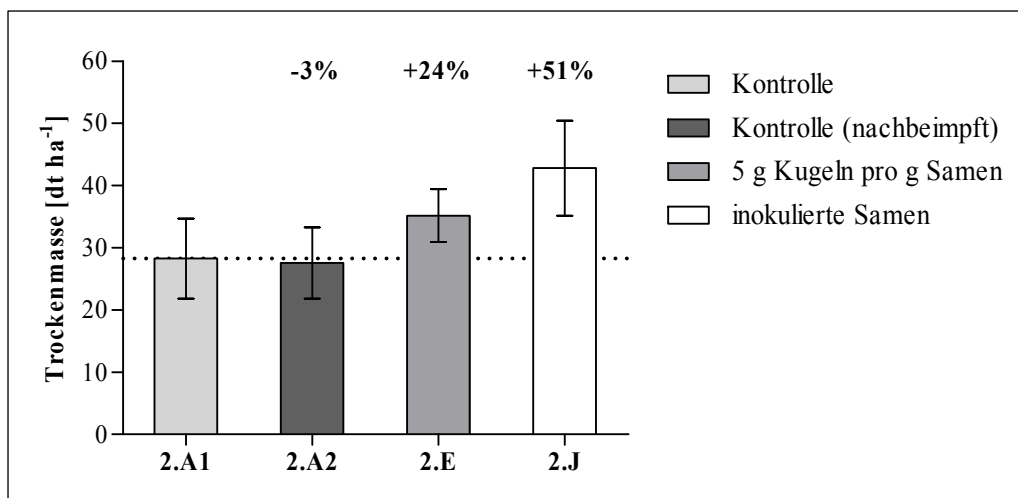


Abb. 19: Auswirkung des Isolats 2.2 auf das Wurzelwachstum von *L. perenne*

Dargestellt ist die getrocknete Wurzelmasse der für 140 d auf REKAL/SAV angezogenen und danach für 77 d ohne Wasserzufuhr belassenen Gräser ($n=5$). Ertragssteigerungen (in %) beziehen sich auf die unbeimpfte Kontrolle (2.A1, gestrichelte Linie). Als Kontrollen wurden sterile Samen ausgesät; mit Isolat 2.2 inokulierte Samen und Alginat-Kugeln wiesen jeweils ca. $2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$ auf. Nach 105 d wurde der Kontroll-Ansatz 2.A2 mit 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen nachbeimpft. Gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach ein und zwei Monaten je ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger.

Die insgesamt bei den vier Varianten 2.A1, 2.A2, 2.E und 2.J in den beiden oberirdischen Schnitten sowie der Wurzelernte bestimmten durchschnittliche Trockenmassen sind in Abb. 20 zusammengefasst dargestellt. Bei der komplett unbeimpften Kontrolle 2.A1 liegt eine addierte Trockenmasse von $63,37 \text{ dt ha}^{-1}$ vor, die nachbeimpfte Kontrolle wies eine um 2% verringerte Masse von $62,14 \text{ dt ha}^{-1}$ auf. Die Zugabe von 5 g Alginat-Kugeln bei der Aussaat erhöhte insgesamt bei Variante 2.E die Trockenmasse um 26% auf $80,03 \text{ dt ha}^{-1}$, und das Anpflanzen von inokulierten Samen brachte die höchste Gesamtbiomasse-Zunahme um 46% auf insgesamt $92,23 \text{ dt ha}^{-1}$. Das Verhältnis von Wurzelmasse zur oberirdischen Trockenmasse des ersten Schnitts betrug etwa 1,7 : 1, bei Addition der Masse von beiden Schnitten lag das Verhältnis ungefähr bei 1 : 1,2.

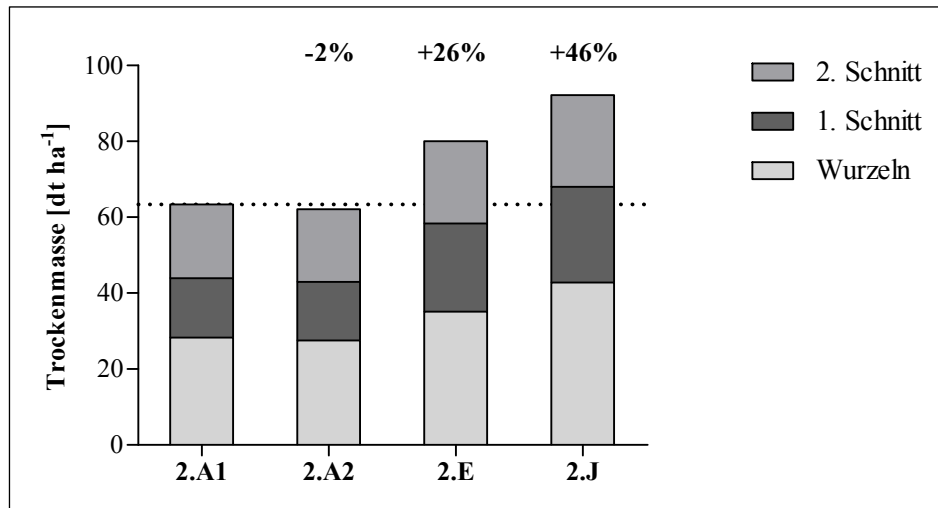


Abb. 20: Addierte Trockenmassen ausgewählter Varianten

Dargestellt sind die addierten durchschnittlichen Trockenmassen der Varianten 2.A1 (unbeimpfte Kontrolle), 2.A2 (nach 105 d mit 10 g Kugeln pro g Samen nachbeimpfte Kontrolle), 2.E (bei Aussaat mit 5 g Kugeln pro g Samen inokuliert) und 2.J (inokulierte Samen). Die Trockenmasse des 1. Schnitts wurde nach 105 d bestimmt, die des 2. Schnitts nach 140 d und die Wurzeltrockenmasse nach 217 d. Ertragssteigerungen (in %) beziehen sich auf die komplett unbeimpfte Kontrolle (2.A1, gestrichelte Linie). Alginat-Kugeln und inokulierte Samen wiesen je ca. $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹ auf.

Die Ansätze aus REKAL/SAV mit Kompost als Dünger wiesen einen pH-Wert von $7,96 \pm 0,02$, eine elektrische Leitfähigkeit von $3,86 \pm 0,01$ mS cm⁻¹ sowie einen Trockensubstanzanteil von $70,0 \pm 0,5\%$ auf. Die Trockensubstanz hatte einen Stickstoff-Gehalt von $0,312 \pm 0,008\%$ und pro 100 g Trockensubstanz lagen $120,4 \pm 0,4$ mg Phosphor, $205,6 \pm 4,1$ mg Kalium, $643,4 \pm 5,6$ mg Magnesium und $66,4 \pm 1,6$ mg Chlor vor, woraus sich ein NaCl-Gehalt von $0,110 \pm 0,002\%$ errechnen lässt.

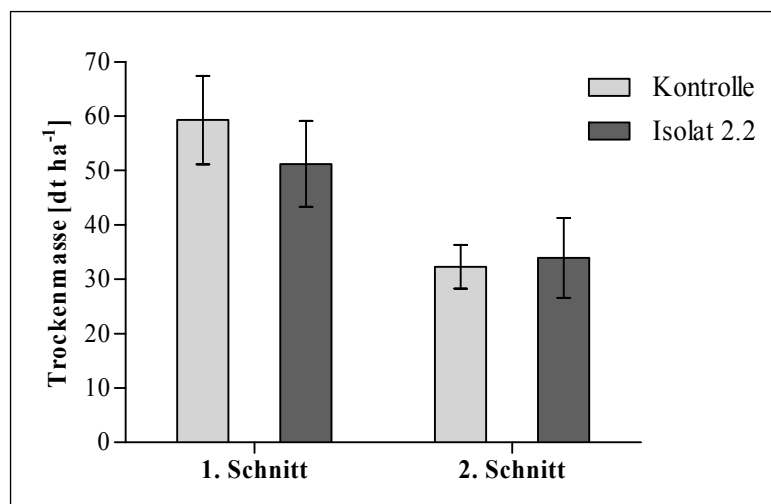


Abb. 21: Auswirkung des Isolats 2.2 auf *L. perenne* unter Kompostzusatz

Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der auf Abdecksubstrat mit beigemischtem Kompost (200 t ha^{-1}) angezogenen Gräser nach 105 d (1. Schnitt) und nach 140 d (2. Schnitt) (n=5). Inokuliert wurde mit Isolat 2.2 in 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen, wobei die Kugeln etwa $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹ aufwiesen.

Die unbeimpfte Kontrolle zeigte nach 105 d eine oberirdische Trockenmasse von $59,27 \pm 8,12 \text{ dt ha}^{-1}$, wohingegen der mit Alginat-Kugeln des Isolats 2.2 inokulierte Ansatz im Schnitt eine um 14% geringere Biomasse von $51,21 \pm 7,88 \text{ dt ha}^{-1}$ aufwies (siehe Abb. 21). Die Erträge des zweiten Schnitts nach weiteren 35 d lagen im Fall der Kontrolle bei $32,29 \pm 4,04 \text{ dt ha}^{-1}$ und der beimpfte Ansatz hatte hier eine Trockenmasse von $33,92 \pm 7,33 \text{ dt ha}^{-1}$, was einer Erhöhung um 5% entspricht ($p > 0,05$).

Der ebenfalls im Experiment genutzte Ackerboden hatte einen pH-Wert von $7,47 \pm 0,02$ und wies eine elektrische Leitfähigkeit von $0,09 \pm 0,03 \text{ mS cm}^{-1}$ sowie einen Trockensubstanzanteil von $90,0 \pm 0,8\%$ auf. Diese Trockensubstanz zeigte einen Stickstoff-Gehalt von $0,138 \pm 0,006\%$ und pro 100 g getrockneten Substrats lagen $60,6 \pm 0,5 \text{ mg}$ Phosphor, $181,3 \pm 0,1 \text{ mg}$ Kalium, $227,6 \pm 1,3 \text{ mg}$ Magnesium und $3,8 \pm 0,2 \text{ mg}$ Chlor vor, was einem NaCl-Gehalt von $0,006\%$ entspricht. Nach 105 d wies die unbeimpfte Kontrolle eine durchschnittliche oberirdischen Trockenmasse von $41,86 \pm 5,14 \text{ dt ha}^{-1}$ auf, der mit Alginat-Kugeln des Isolats 2.2 inokulierte Ansatz zeigte eine um 2% ($p > 0,05$) verringerte Biomasse von $40,91 \pm 3,61 \text{ dt ha}^{-1}$. Nach weiteren 35 d lieferte die Kontrolle mit $22,13 \pm 2,20 \text{ dt ha}^{-1}$ einen um ca. 2% niedrigeren Ertrag als die beimpfte Variante mit $22,47 \pm 1,27 \text{ dt ha}^{-1}$ ($p > 0,05$) (siehe Abb. 22).

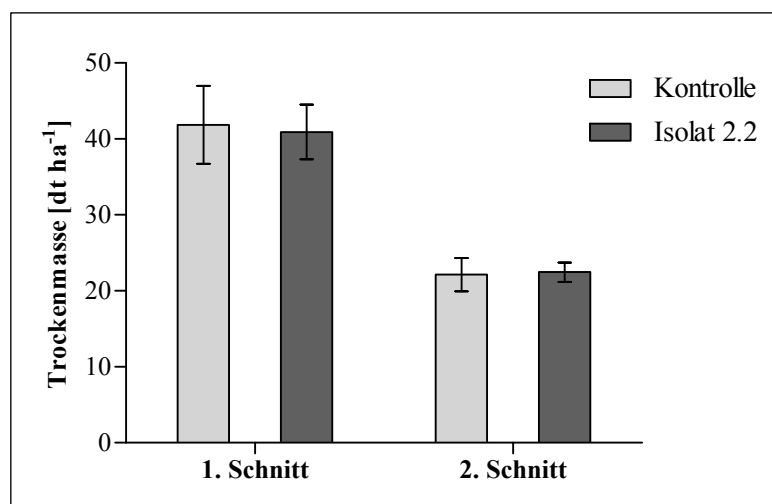


Abb. 22: Auswirkung des Isolats 2.2 auf das Wachstum von *L. perenne* in Ackerboden

Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der auf Ackerboden angezogenen Gräser nach 105 d (1. Schnitt) und nach 140 d (2. Schnitt) ($n=5$). Inokuliert wurde mit Isolat 2.2 in 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen, wobei die Kugeln etwa $2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$ aufwiesen. Gedüngt wurde nach ein und zwei Monaten je ein Mal mit NPK-Volldünger.

3.7 Dritter Gewächshausversuch mit Isolat 2.2

Das dritte Experiment im Gewächshaus diente der Verifizierung der vorherigen Einflüsse des Isolats 2.2 auf das Wachstum der Pionierpflanze Deutsches Weidelgras. Auch sollten hier erste Beurteilungen der Rhizosphärenbesiedlung *in vivo* statt finden.

Die zur Markierung des Stamms spontan durch Mutation induzierten Resistenzen gegen die Antibiotika Rifampicin und Streptomycin hatten keine große Auswirkung auf die Wachstumsfähigkeit des Stamms (siehe Abb. 23). Im Vergleich zum Wildtyp 2.2 zeigte die markierte Mutante 2.2 Rif^r Sm^r ein geringfügig verlangsamtes Wachstum, welches *in vitro* durch Zugabe von Rifampicin und Streptomycin zum Medium noch weiter beeinträchtigt wurde.

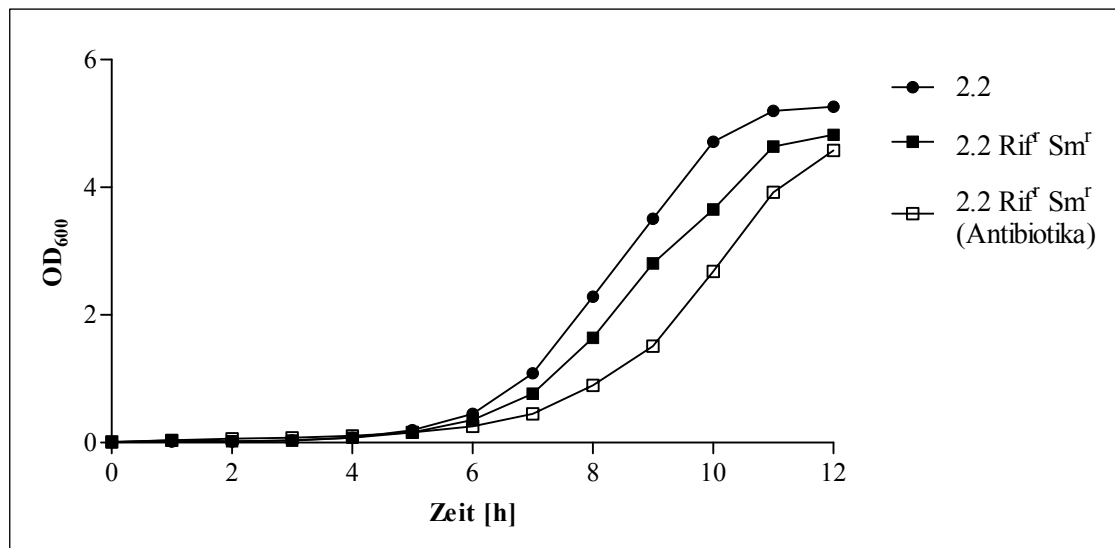


Abb. 23: Wachstumskurven der Stämme 2.2 und 2.2 Rif^r Sm^r

Dargestellt ist das Wachstum der Stämme in Abhängigkeit von der Zeit. Standard-I-Nährmedium (teilweise zzgl. je 50 µg ml⁻¹ Rifampicin und Streptomycin) wurden mit $1,5 \cdot 10^8$ Zellen beimpft und stündlich die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gemessen.

Das im dritten Gewächshausversuch genutzte entsalzte REKAL/SAV hatte einen pH-Wert von $7,96 \pm 0,03$, eine elektrische Leitfähigkeit von $3,82 \pm 0,10$ mS cm⁻¹ und der Trockensubstanzanteil lag bei $87,6 \pm 1,2\%$. Diese Trockensubstanz wies einen Stickstoff-Gehalt von $0,180 \pm 0,008\%$ auf und pro 100 g lagen $108,7 \pm 2,5$ mg Phosphor, $147,4 \pm 7,9$ mg Kalium, $625,3 \pm 33,4$ mg Magnesium und $35,9 \pm 3,9$ mg Chlor vor. Hieraus ließ sich wiederum ein NaCl-Gehalt von $0,059 \pm 0,006\%$ errechnen. In den zur Inokulation genutzten Kugeln ließen sich etwa $2 \cdot 10^9$ CFU pro Gramm Kugeln nachweisen, auf den in Methylcellulose inokulierten Samen hafteten etwa 10^9 CFU g⁻¹ an.

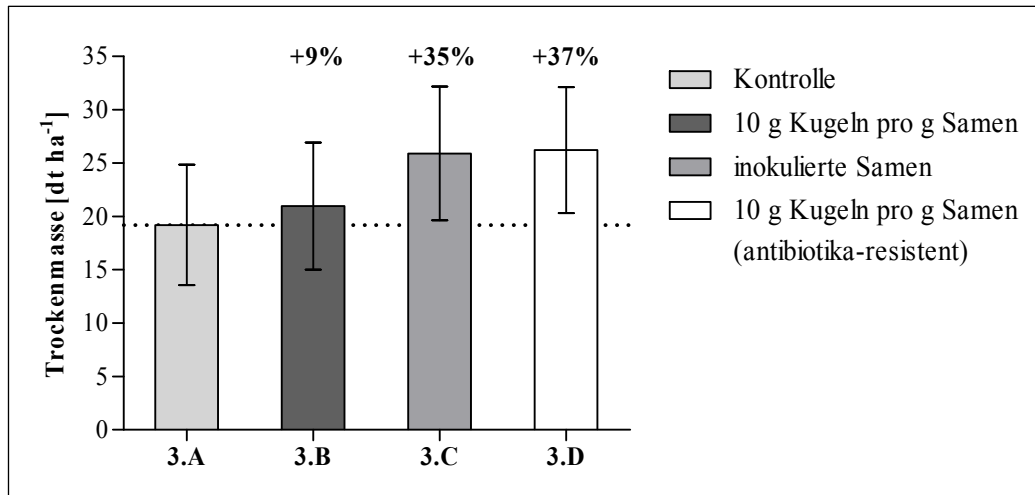


Abb. 24: Auswirkung verschiedener Inokulationen auf das Wachstum von *L. perenne*

Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der für 105 d auf REKAL/SAV angezogenen Gräser (n=5). Ertragssteigerungen (in %) beziehen sich auf die unbeimpfte Kontrolle (3.A, gestrichelte Linie). Mit Isolat 2.2 inokulierte Samen wiesen etwa 10^9 CFU g⁻¹ auf und Alginat-Kugeln ca. $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹. Die Zellen in Ansatz 3.D wurden durch spontane Mutation gegen die Antibiotika Rifampicin und Streptomycin resistent gemacht. Gedüngt wurde bei der Aussaat mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und nach ein und zwei Monaten je ein weiteres Mal mit NPK-Volldünger.

Wie in Abb. 24 zu erkennen ist, brachte eine Inokulation mit dem Wildtyp des Isolats 2.2 durch die Applikation von 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen nach 105 d eine Ertragssteigerung von $19,20 \pm 5,66$ dt ha⁻¹ (3.A) auf $20,96 \pm 5,97$ dt ha⁻¹ (3.B), was einer Erhöhung um 9% entspricht. Die Inokulation über vorherige Anheftung der Zellen an die Samenhülle erhöhte die durchschnittliche oberirdische Trockenmasse um 35% auf insgesamt $25,90 \pm 6,27$ dt ha⁻¹ (3.C). Die in Alginat-Kugeln eingeschlossenen Zellen, die zuvor mit zwei Antibiotika-Resistenzen (Rif^r und Sm^r) markiert wurden, sorgten für eine um 37% erhöhte Biomasse in Form von $26,22 \pm 5,89$ dt ha⁻¹ (3.D).

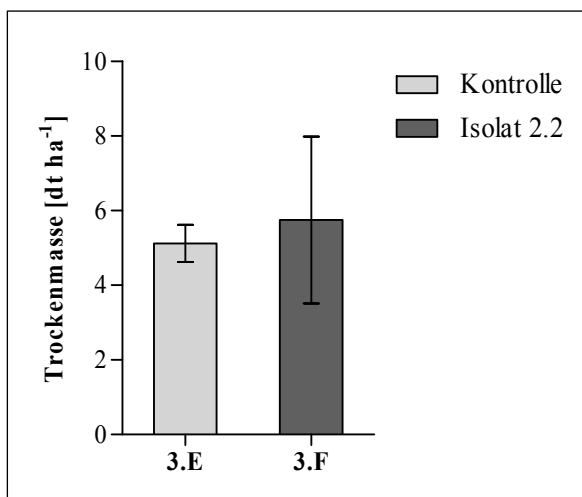


Abb. 25: Auswirkung des Isolats 2.2 auf das Wachstum von ungedüngtem Weidelgras

Dargestellt ist die getrocknete oberirdische Biomasse der für 105 d auf REKAL/SAV angezogenen Weidelgräser (n=4). Inokuliert wurde mit Isolat 2.2 in 10 g Alginat-Kugeln pro g Samen, wobei die Kugeln ca. $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹ aufwiesen. Es erfolgte keine Düngung.

Der Effekt des Isolats 2.2 auf das Wachstum von *L. perenne* ohne zusätzliche Düngung ist in Abb. 25 zu sehen. Im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle mit $5,12 \pm 0,50 \text{ dt ha}^{-1}$ oberirdischer Trockenmasse erhöhte die Zugabe des Isolats in Form von Alginat-Kugeln die Biomasse um 12% auf $5,74 \pm 2,23 \text{ dt ha}^{-1}$. Insgesamt war hier im Gewächshausversuch bei keinem der inokulierten Ansätze eine signifikante Steigerung der Trockenmasse zu verzeichnen ($p > 0,05$). Die Analyse-Ergebnisse der oberirdischen Trockenmasse sind in Tab. 11 aufgeführt.

Tab. 11: Nährstoffgehalte der oberirdischen Trockenmasse (dritter Gewächshausversuch)

Variante	Stickstoff [%]	Phosphor [mg 100 g ⁻¹]	Kalium [mg 100 g ⁻¹]	Magnesium [mg 100 g ⁻¹]
3.A	$3,24 \pm 0,16$	$124,3 \pm 5,8$	$2970,2 \pm 229,3$	$434,8 \pm 52,4$
3.B	$3,02 \pm 0,19$	$112,3 \pm 13,6$	$3222,7 \pm 495,3$	$481,0 \pm 64,6$
3.C	$2,99 \pm 0,13$	$114,2 \pm 11,9$	$3247,7 \pm 229,3$	$434,4 \pm 22,3$
3.D	$3,01 \pm 0,27$	$123,0 \pm 25,8$	$3425,7 \pm 345,7$	$498,8 \pm 55,8$
3.E	$3,24 \pm 0,12$	$53,9 \pm 2,0$	$3296,4 \pm 216,0$	$489,2 \pm 14,8$
3.F	$3,24 \pm 0,16$	$64,6 \pm 18,3$	$3095,5 \pm 366,9$	$464,0 \pm 26,2$

Nur in einem der fünf Töpfe (Nr. 17) der markierten Variante 3.D ließ sich nach etwa drei Monaten das durch zwei Antibiotika-Resistenzen markierte Isolat 2.2 nachweisen. Hierbei zeigten sich auf den entnommenen Wurzeln etwa $2 \cdot 10^3 \text{ CFU}$ pro Gramm Wurzelfrischmasse in der kultur-abhängigen Methode.

3.5 Weiterführende Untersuchungen des Isolats 2.2

Ausgehend von der positiven Beeinflussung des Pflanzenwachstums in den Gewächshausversuchen wurde das Isolat 2.2 genauer charakterisiert und identifiziert.

3.5.1 Identifizierung anhand der ribosomalen DNA

Die Sequenzierung von insgesamt 1477 bp des 16S rRNA-Gens von Isolat 2.2 (siehe Anhang) zeigte, dass zwei Positionen überlagerte Basen aufweisen: an Position 971 der ermittelten Sequenz liegen Adenin und Guanin (= R) übereinander und an Position 1072 die Basen Adenin und Cytosin (= M). Ein Datenbank-Abgleich der Sequenz zeigte (unter Berücksichtigung der überlagerten Basen) die höchsten Übereinstimmungen von 1474 der 1477 Basen (99,8%) mit den Stämmen *Pseudomonas fluorescens* Pf29A sowie *Pseudomonas* sp. K94.37 (siehe Tab. 12). Mithilfe der Basenabfolge erstellte Stammbäume zur Verdeutlichung der Verwandtschaft des Isolats 2.2 zu anderen *Pseudomonas*-Typstämmen sind in Abb. 26 und Abb. 27 zu sehen.

Die Sequenz der ITS1-Region konnte mit den hier genutzten Methoden nicht ermittelt werden.

Tab. 12: 16S rDNA-Sequenzübereinstimmungen von Isolat 2.2 mit anderen Stämmen

Aufgelistet sind die ersten zehn Sequenzen mit höchster Übereinstimmung (Zugriff: 27.04.10)

a) In Klammern angegeben sind die übereinstimmenden Basen sowie die eingefügten Lücken

Stamm	Accession No.	Übereinstimmung ^a
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf29A	DQ473439	99,8% (1474/1477; 0)
<i>Pseudomonas</i> sp. K94.37	DQ453820	99,8% (1474/1477; 0)
<i>Pseudomonas</i> sp. TUT1394	AB308445	99,8% (1472/1475; 0)
<i>Pseudomonas</i> sp. P97.30	DQ453822	99,7% (1473/1477; 0)
<i>Pseudomonas</i> sp. K94.31	DQ453819	99,7% (1473/1477; 0)
<i>Pseudomonas</i> sp. K93.2	DQ453818	99,7% (1473/1477; 0)
<i>Pseudomonas</i> sp. CM1'A2	AJ417068	99,7% (1473/1477; 0)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> Ps 2-3	EU854429	99,7% (1474/1478; 1)
<i>Pseudomonas aurantiaca</i> VKM B-1524	AY271792	99,7% (1472/1477; 0)
<i>Pseudomonas</i> sp. Q65c-80	AJ417074	99,7% (1472/1477; 0)

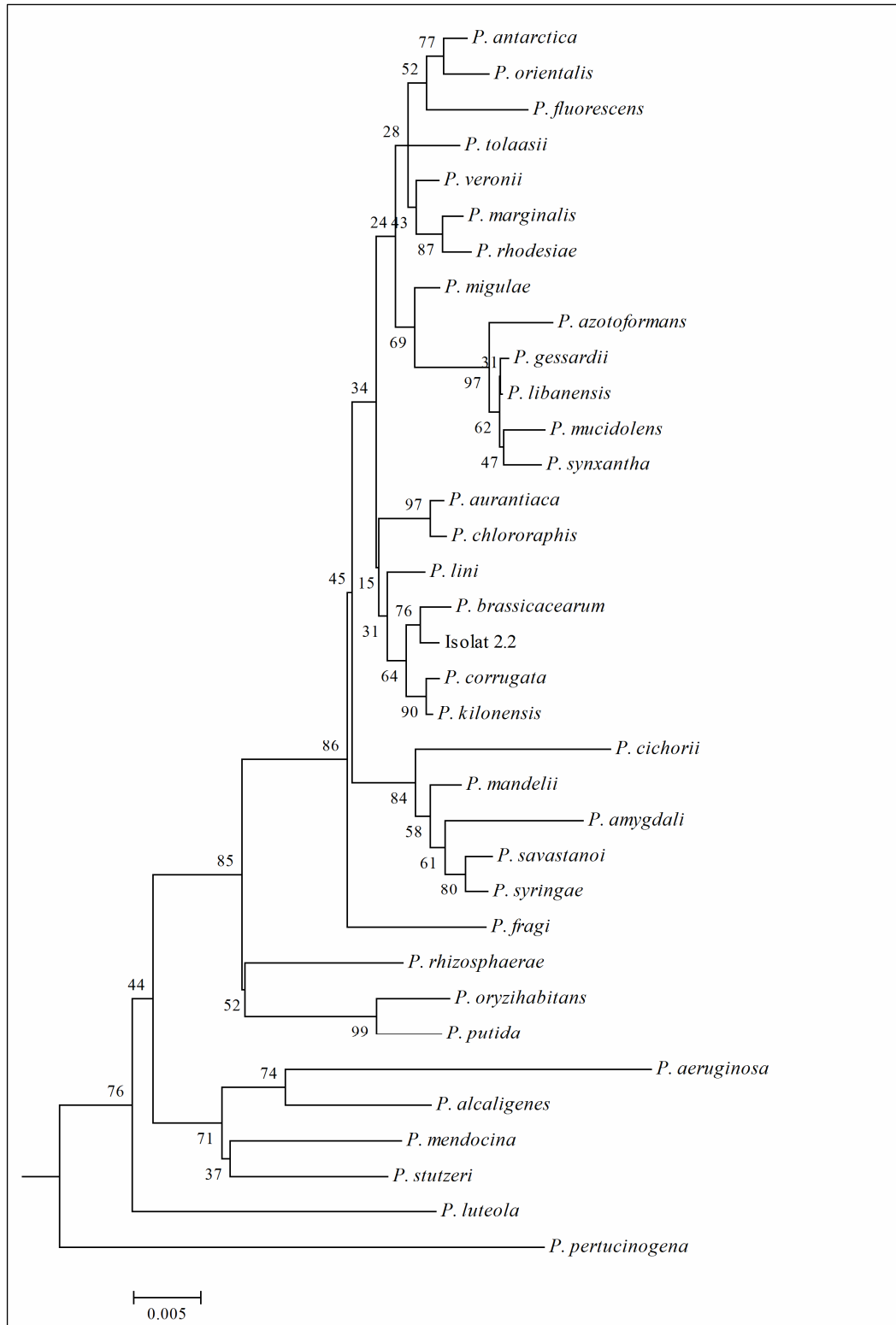


Abb. 26: Evolutionäres Verhältnis von Isolat 2.2 zu 34 *Pseudomonas*-Typstämmen (ME)
 Dargestellt ist der anhand der *Minimum Evolution*-Methode (ME) erstellte optimale Baum mit der Gesamtlänge von 0,43715944. An den Ästen angegeben sind die *Bootstrap*-Werte (in Prozent) der insgesamt 10000 Replikate. Die Distanz-Matrix wurde per *Kimura 2-Parameter*-Methode unter der *Complete deletion*-Option berechnet. Genutzt wurde der *Close Neighbor Interchange*-Algorithmus mit dem Such-Grad von 1, der Ausgangsbaum wurde per *Neighbor Joining*-Methode berechnet. Das Alignment bestand insgesamt aus 1374 Positionen und Grundlage war die Sequenz der 16S rDNA. Als *Outgroup* diente *E. coli* BW2952.

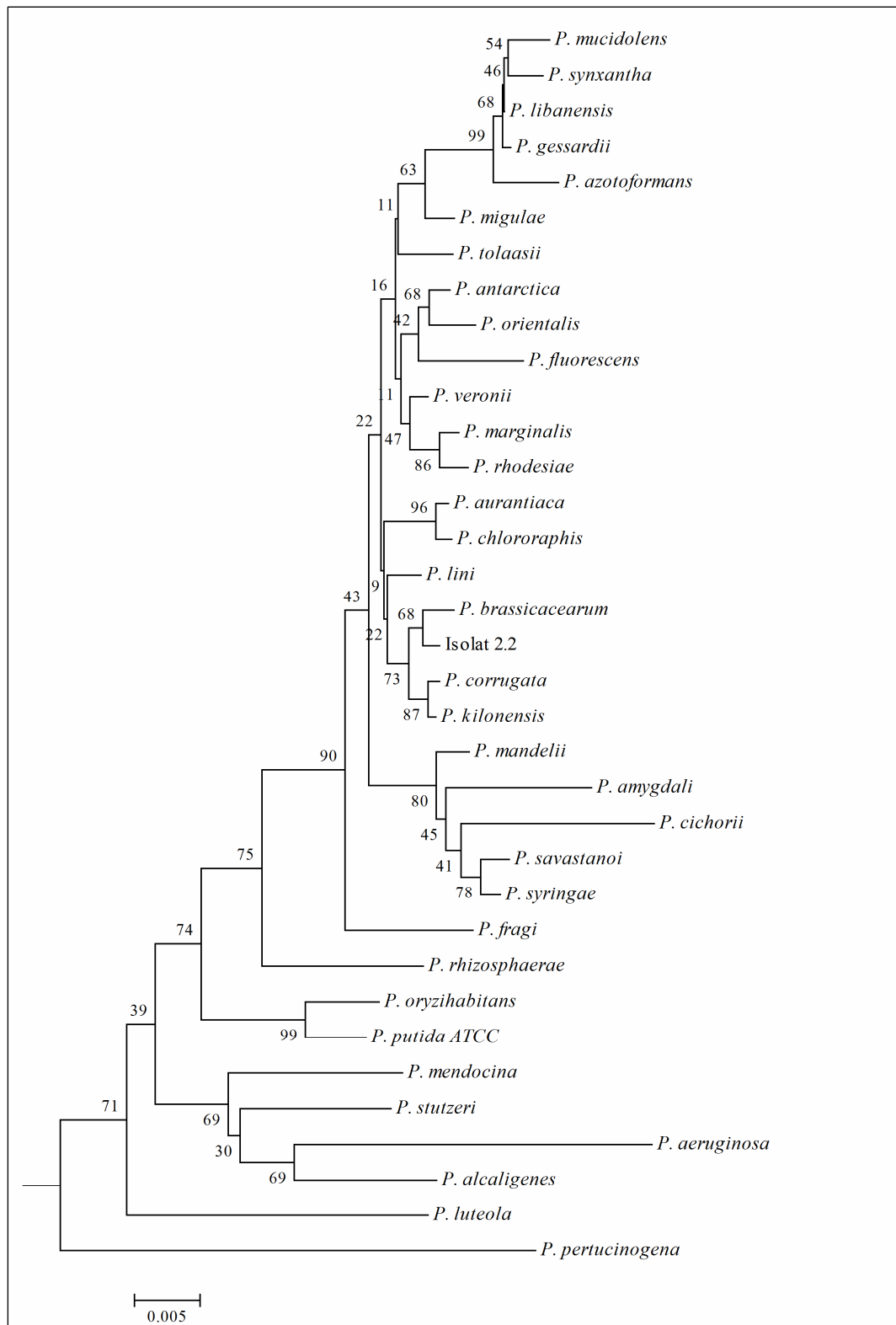


Abb. 27: Evolutionäres Verhältnis von Isolat 2.2 zu 34 *Pseudomonas*-Typstämmen (NJ)
 Dargestellt ist der anhand der *Neighbor Joining*-Methode (NJ) erstellte optimale Baum mit der Gesamtlängte von 0,43849704. An den Ästen angegeben sind die *Bootstrap*-Werte (in Prozent) der insgesamt 10000 Replikate. Die Distanz-Matrix wurde per *Kimura 2-Parameter*-Methode unter der *Complete deletion*-Option berechnet. Das Alignment bestand insgesamt aus 1374 Positionen und Grundlage war die Sequenz der 16S rDNA. Als *Outgroup* diente *E. coli* BW2952.

3.5.2 Weitere Differenzierungsmaßnahmen

Eine Fettsäureanalyse des Isolats 2.2 lieferte eine maximale Übereinstimmung von etwa 68% mit der Spezies *Paucimonas lemoignei*, mit Werten von ca. 42% bis 56% stimmte das Fettsäuremuster mit dem verschiedener Subspezies von *Pseudomonas syringae* und *Pseudomonas savastanoi* überein (siehe Tab. 13).

Die hauptsächlich (> 1%) gefundenen Fettsäuren waren 10:0 3OH (3,55%), 12:0 (7,30%), 12:0 3OH (3,80%), Sum in Feature 3 (16:1 w7c / 15 iso 2OH mit 29,79% sowie 15:0 iso 2OH / 16:1 w7c mit 2,60%), 16:0 (24,97%), 17:0 cyclo (4,71%) und 18:1 w7c (19,78%).

Tab. 13: Spezies-Übereinstimmung der Fettsäureanalyse

Sim Index	Spezies
0,677	<i>Paucimonas lemoignei</i>
0,556	<i>Pseudomonas syringae phaseolicola</i>
0,528	<i>Pseudomonas syringae syringae</i>
0,500	<i>Pseudomonas savastanoi oleae</i>
0,446	<i>Pseudomonas syringae glycinea</i>
0,420	<i>Pseudomonas savastanoi nerium</i>

Eine automatische Differenzierung des Isolats mittels des VITEK[®] 2 XL Systems wies den Stamm mit einer Wahrscheinlichkeit von 33,57% als *Acinetobacter baumannii* complex, zu 33,22% als *Pseudomonas fluorescens* und zu 33,22% als *Acinetobacter haemolyticus* aus. Die Ergebnisse der Einzelreaktionen sind im Anhang (Tab. 27) dargestellt.

Ein vom VITEK[®] System automatisch erstelltes sowie ein manuell gefertigtes Antibiotogramm sind im Anhang (Tab. 28 und Tab. 29) zu finden.

3.5.3 Untersuchung physiologischer Eigenschaften

Eine Aufstellung der von Isolat 2.2 verwertbaren Kohlenstoffquellen ist in Tab. 14 zu sehen. Von den 49 getesteten Substanzen konnten nach zwei Tagen 14 verwertet werden, und nach weiteren drei Tagen waren insgesamt 17 zum Wachstum genutzt.

Tab. 14: Verwertung von Kohlenstoffquellen durch das Isolat 2.2 anhand des API 50 CH

-) kein Wachstum, +) Wachstum nach 2 d, (+) Wachstum nach 5 d

Substrat	Ergebnis	Substrat	Ergebnis
Glycerin	+	Salicin	-
Erythrinol	-	D-Cellobiose	-
D-Arabinose	-	D-Maltose	-
L-Arabinose	+	D-Lactose	-
D-Ribose	+	D-Melibiose	-
D-Xylose	+	D-Saccharose	+
L-Xylose	-	D-Trehalose	(+)
D-Adonitol	-	Inulin	-
Methyl-βD-Xylopyranosid	-	D-Melezitose	-
D-Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glukose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylit	-
L-Sorbose	-	Gentiobiose	-
L-Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	(+)
Inositol	+	D-Tagatose	-
D-Mannitol	+	D-Fucose	-
D-Sorbitol	(+)	L-Fucose	-
Methyl-αD-Mannopyranosid	-	D-Arabitol	+
Methyl-αD-Glycopyranosid	-	L-Arabitol	-
N-Acetylglucosamin	-	Kaliumgluconat	+
Amygdalin	-	Kalium-2-Ketogluconat	+
Arbutin	-	Kalium-5-Ketogluconat	-
Esculin Eisencitrat	-		

Isolat 2.2 wächst bei 4°C und auch ohne zusätzliche Vitamine und Spurenelemente im Medium. Das Wachstum des Stamms sowohl in normalem M9-Minimalmedium als auch in der Variante mit 3 mM ACC als einziger Stickstoffquelle ist in Abb. 28 dargestellt.

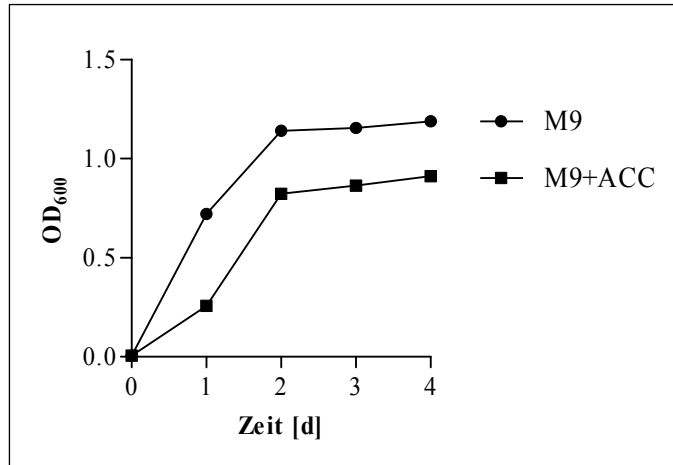


Abb. 28: Wachstum von Isolat 2.2 mit ACC als Stickstoffquelle
Dargestellt sind Wachstumskurven in normalem M9-Minimalmedium (M9) und dem gleichen Medium mit 3 mM ACC als einziger Stickstoffquelle (M9+ACC). 20 ml Medium wurden mit 10⁸ CFU beimpft, bei 28°C und 140 rpm inkubiert und täglich die optische Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) gemessen.

Die Fähigkeit des Isolats zur Synthese von Auxinen in Minimal- und Vollmedium unter Abhängigkeit der Tryptophan-Zugabe ist in Abb. 29 zu sehen. In M9-Minimalmedium ohne zusätzliches Tryptophan produzierte das Isolat $0,49 \pm 0,10 \mu\text{g ml}^{-1} \text{OD}_{600}^{-1}$ und mit Zugabe von 1 mM der Aminosäure $5,41 \pm 0,71 \mu\text{g ml}^{-1} \text{OD}_{600}^{-1}$. Bei Nutzung eines Vollmediums synthetisierte der Stamm im reinen Medium $1,80 \pm 0,30 \mu\text{g ml}^{-1} \text{OD}_{600}^{-1}$ und mit Tryptophan-Zusatz $3,22 \pm 0,25 \mu\text{g ml}^{-1} \text{OD}_{600}^{-1}$.

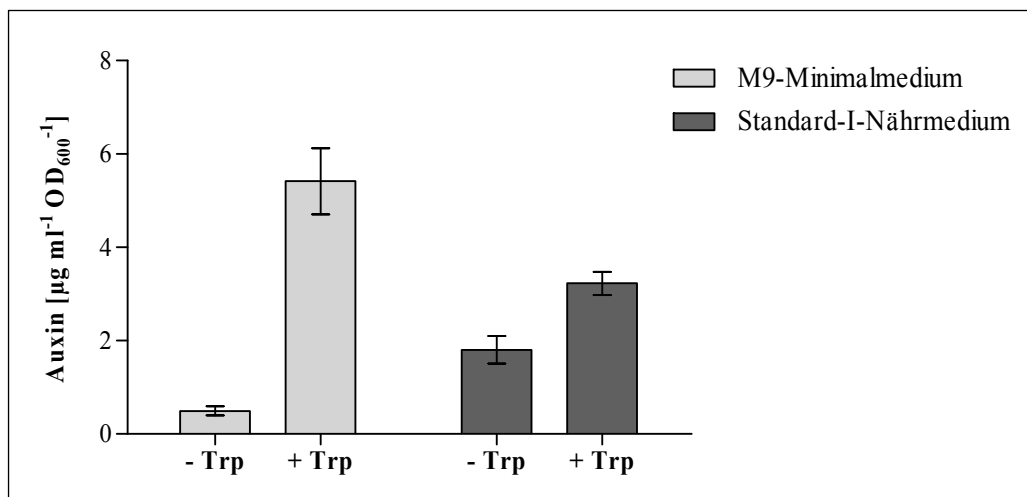


Abb. 29: Auxin-Synthese des Isolats 2.2 unter verschiedenen Bedingungen (normalisiert)
Dargestellt ist die synthetisierte Menge an Auxin (normalisiert auf die Zelldichte). Hierfür wurden 20 ml des jeweiligen Mediums teilweise mit 1 mM L-Tryptophan versetzt (\pm Trp), mit 10⁸ CFU inokuliert und bei 140 rpm und 28°C für 48 h inkubiert. Der Auxin-Nachweis erfolgte über Anfärbung des zellfreien Überstands mit Salkowski-Reagenz (n=3).

Die absolute Konzentration an Auxinen lag im reinen M9-Minimalmedium bei $0,79 \pm 0,17 \mu\text{g ml}^{-1}$ und verzehnfachte sich durch Tryptophan-Zugabe auf $7,87 \pm 1,21 \mu\text{g ml}^{-1}$. Im Vollmedium betrug die Auxin-Konzentration ohne Zusatz der chemischen Vorstufe $8,00 \pm 0,95 \mu\text{g ml}^{-1}$ und verdoppelte sich mit Tryptophan nahezu auf $15,04 \pm 0,62 \mu\text{g ml}^{-1}$ (siehe Abb. 30).

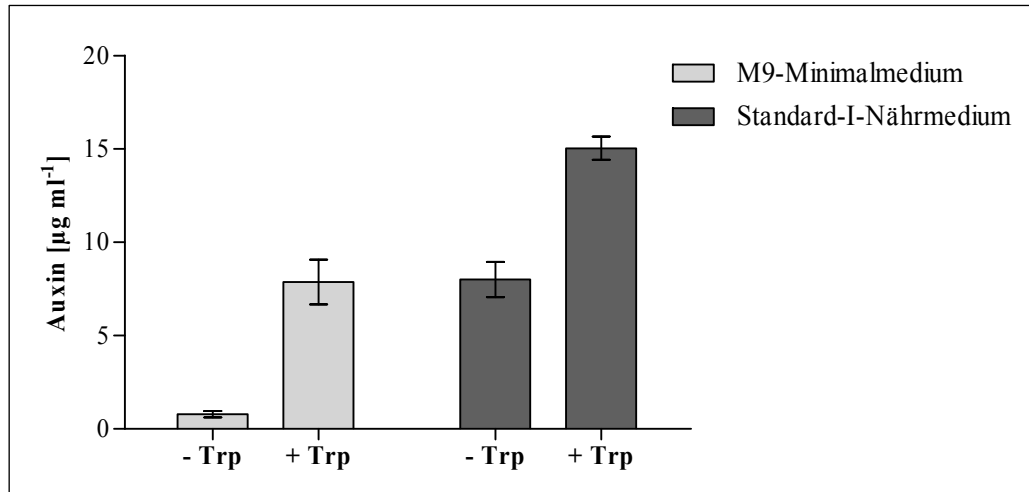


Abb. 30: Auxin-Synthese des Isolats 2.2 unter verschiedenen Bedingungen (absolut)
 Dargestellt ist die synthetisierte absolute Menge an Auxin. Hierfür wurden 20 ml des jeweiligen Mediums teilweise mit 1 mM L-Tryptophan versetzt (\pm Trp), mit 10^8 CFU inokuliert und bei 140 rpm und 28°C für 48 h inkubiert. Der Auxin-Nachweis erfolgte über Anfärbung des zellfreien Überstands mit Salkowski-Reagenz (n=3).

3.8 *In vitro* Pflanzenversuche mit Isolat 2.2

Der Einfluss der Zelldichte des Isolats 2.2 auf das Wachstum der Sprosse und Wurzeln von Keimlingen des *L. perenne* unter *in vitro* Bedingungen ist in Abb. 31 verdeutlicht. Mit zunehmender Zellzahl in der Lösung nahm die Länge aller Pflanzenteile teilweise signifikant zu, wobei die Wurzeln ab einer Zelldichte von etwa 10^6 CFU ml⁻¹ hoch signifikant im Längenwachstum beeinflusst wurden (siehe Tab. 15).

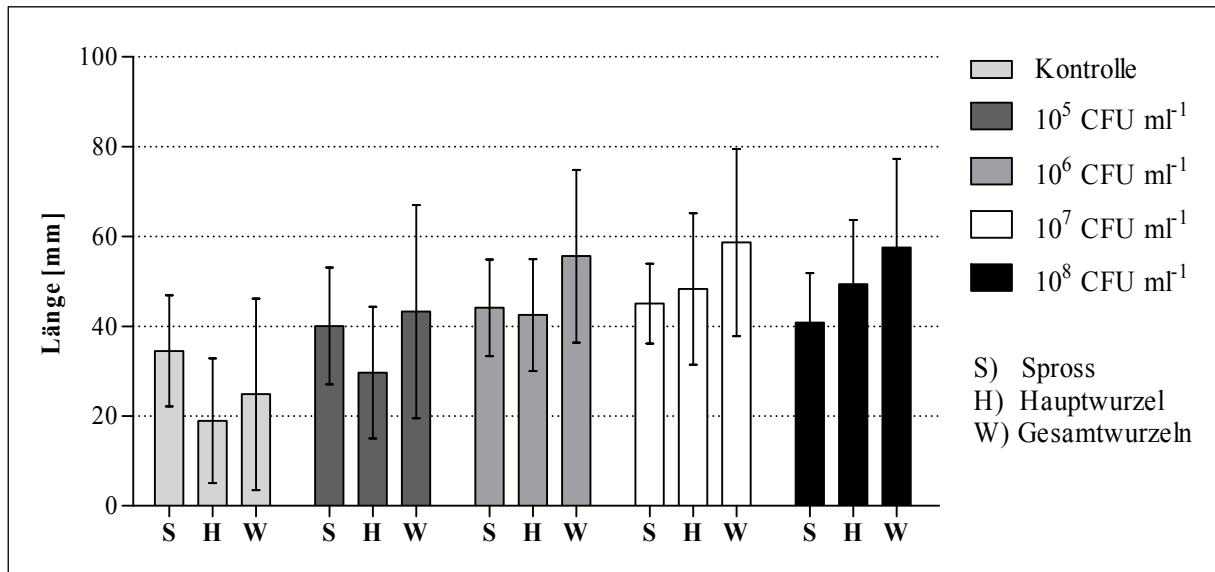


Abb. 31: Zelldichteabhängige Pflanzenwachstums-Förderung von Isolat 2.2

Dargestellt ist das Längenwachstum von *L. perenne*, aufgeteilt in Spross (S), Hauptwurzel (H) und Summe der Längen von Haupt- und Seitenwurzeln (W). Oberflächensterilisierte Samen wurden für 10 d auf sterilem Filterpapier in Petrischalen mit 5 ml A. bidest (Kontrolle) bzw. Suspensionen mit unterschiedlichen Zelldichten angezogen ($n \geq 17$).

Tab. 15: Dunnett-Test des Pflanzenversuchs unter Zelldichteabhängigkeit

Vergleich	Spross	Haupt- wurzel	Gesamt- wurzeln
Kontrolle vs. 10^5 CFU ml ⁻¹	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Kontrolle vs. 10^6 CFU ml ⁻¹	$p < 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Kontrolle vs. 10^7 CFU ml ⁻¹	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Kontrolle vs. 10^8 CFU ml ⁻¹	$p > 0,05$	$p < 0,001$	$p < 0,001$

3.9 Mikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung durch Isolat 2.2

Mittels zweier unterschiedlicher Mikroskopie-Techniken sollte dokumentiert werden, wie das Isolat 2.2 die Keimlingswurzeln von *Lolium perenne* besiedelt.

3.9.1 Fluoreszenz-Mikroskopie

Durch eine Markierung des Isolats 2.2 mit dem grün fluoreszierenden Protein (GFP) wurde dessen Besiedlungsfähigkeit fluoreszenz-mikroskopisch beurteilt. Der Erfolg der Übertragung des GFP-Plasmids pSM1890 (Sm^r , Gm^r) vom Donor *E. coli* cc118 λ pir auf das Isolat konnte anhand einer *fingerprint*-PCR nachgewiesen werden: die spezifischen Bandenmuster des markierten Stamms stimmten mit denen des Isolats überein und unterschieden sich deutlich von denen des Donors und des Helferstamms *E. coli* HB101 (ohne Abbildung). Der Einfluss der Markierung auf das Isolat ist in Abb. 32 zu sehen, wo sich bei dem markierten Stamm 2.2 (pSM1890) ein deutlich verlangsamtes Wachstum im Gegensatz zum Wildtyp 2.2 zeigt.

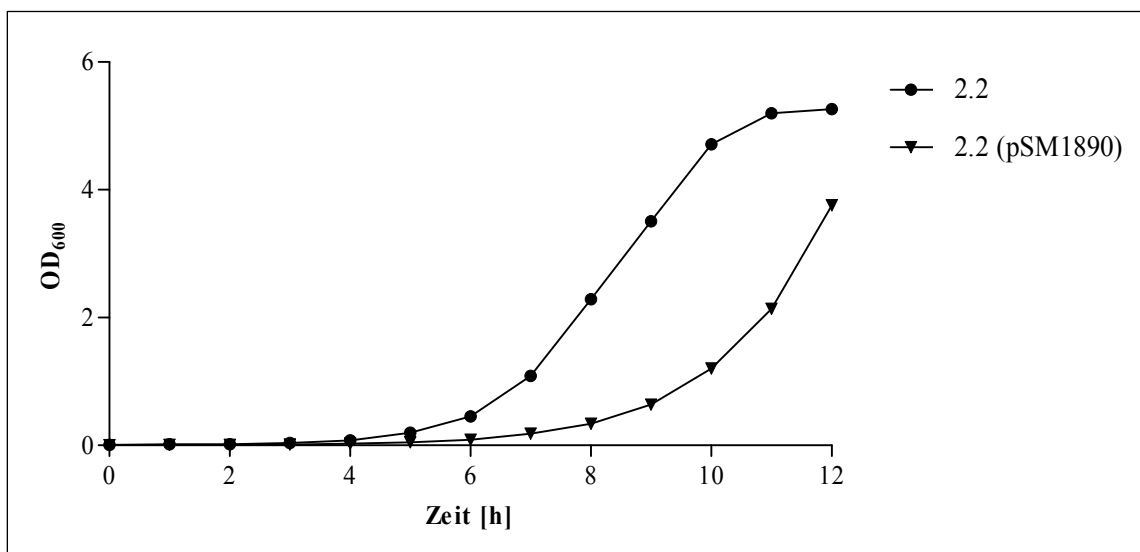


Abb. 32: Wachstumskurven der Stämme 2.2 und 2.2 (pSM1890)

Dargestellt ist das Wachstum der Stämme in Abhängigkeit von der Zeit. Standard-I-Nährmedien (teilweise zzgl. je $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Streptomycin und Gentamycin) wurden mit $1,5 \cdot 10^8$ Zellen beimpft und stündlich die optische Dichte bei 600 nm (OD_{600}) gemessen.

Nach etwa sechs Wochen konnten auf den Wurzeln von durchgängig gegossenen Weidelgräsern, die in der Gewächskammer auf sterilem Abdecksubstrat angezogen und pro Samen mit jeweils einer Alginat-Kugel (mit ca. $2 \cdot 10^9 \text{ CFU g}^{-1}$) inokuliert wurden, pro Gramm feuchter Wurzelfrischmasse ca. $5 \cdot 10^7 \text{ CFU}$ nachgewiesen werden. Diese Zellzahlen galten sowohl mit als auch ohne Streptomycin und Gentamycin im Medium.

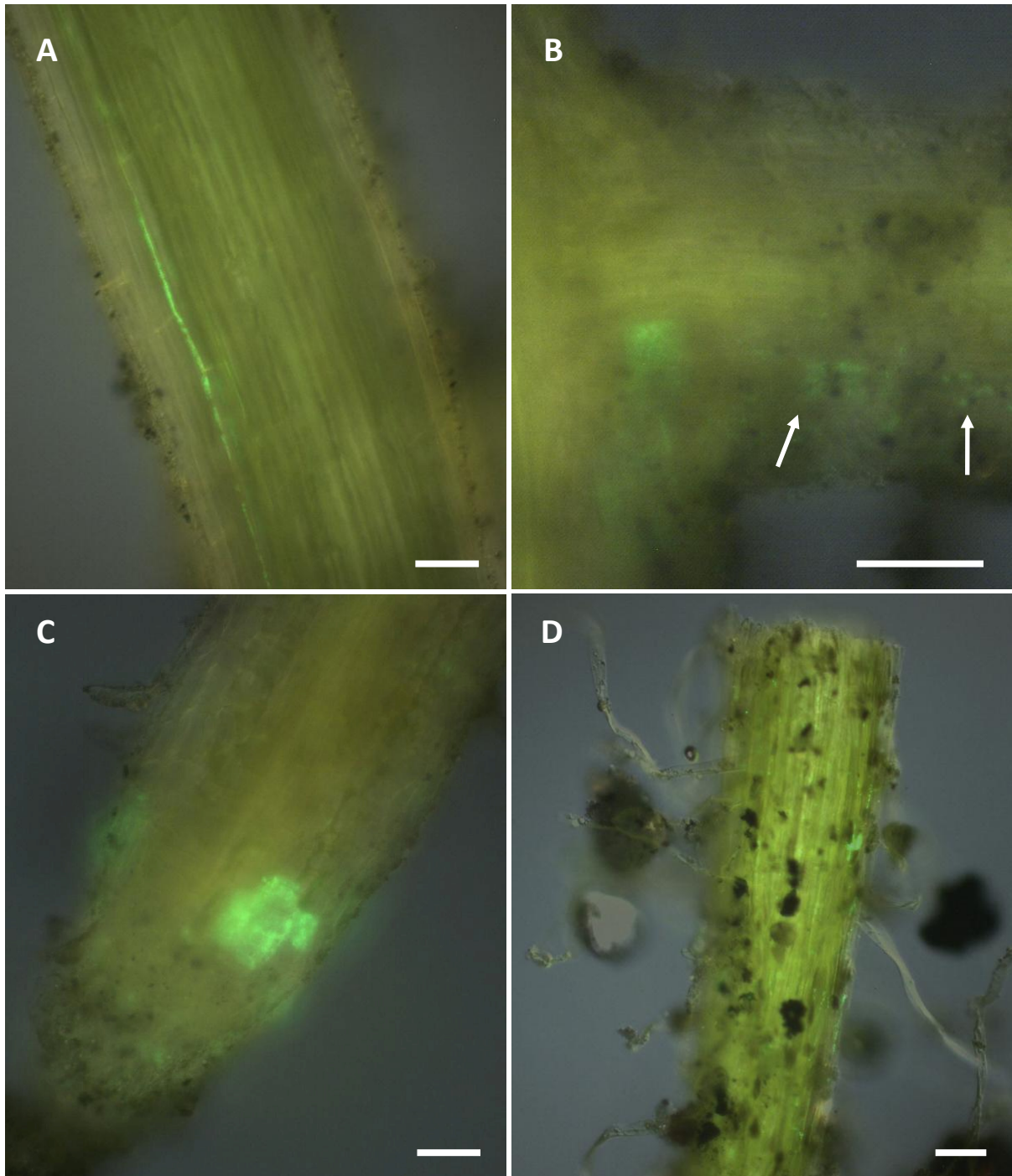


Abb. 33: Fluoreszenz-mikroskopische Darstellung der Wurzelbesiedlung durch Isolat 2.2

Oberflächensterilisierte Samen von *Lolium perenne* wurden pro Samenkorn mit je einer Alginat-Kugel mit immobilisierten Zellen des GFP-markierten Isolats 2.2 (pSM1890) (ca. $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹) inokuliert und in sterilem REKAL/SAV für sechs Wochen angezogen. Dabei wurden die Pflanzen entweder fortwährend (A, B, C) oder nur die ersten drei Wochen (D) gegossen. Dargestellt sind per Computer überlagerte Durchlicht- und Fluoreszenzbilder (der Balken entspricht jeweils 40 µm).

(A) Hauptwurzel mit langgezogener Mikrokolonie. (B) Von der Hauptwurzel abzweigende Seitenwurzel mit Mikrokolonie an der Basis und verstreuten Einzelzellen (Pfeile). (C) Dicht besiedelte Wurzelspitze mit großer Mikrokolonie und Einzelzellen. (D) Basis einer trockenen Hauptwurzel mit Mikrokolonien und zahlreichen Einzelzellen. Auf allen Bildern sichtbar sind auch Partikel des Abdecksubstrats (schwarz).

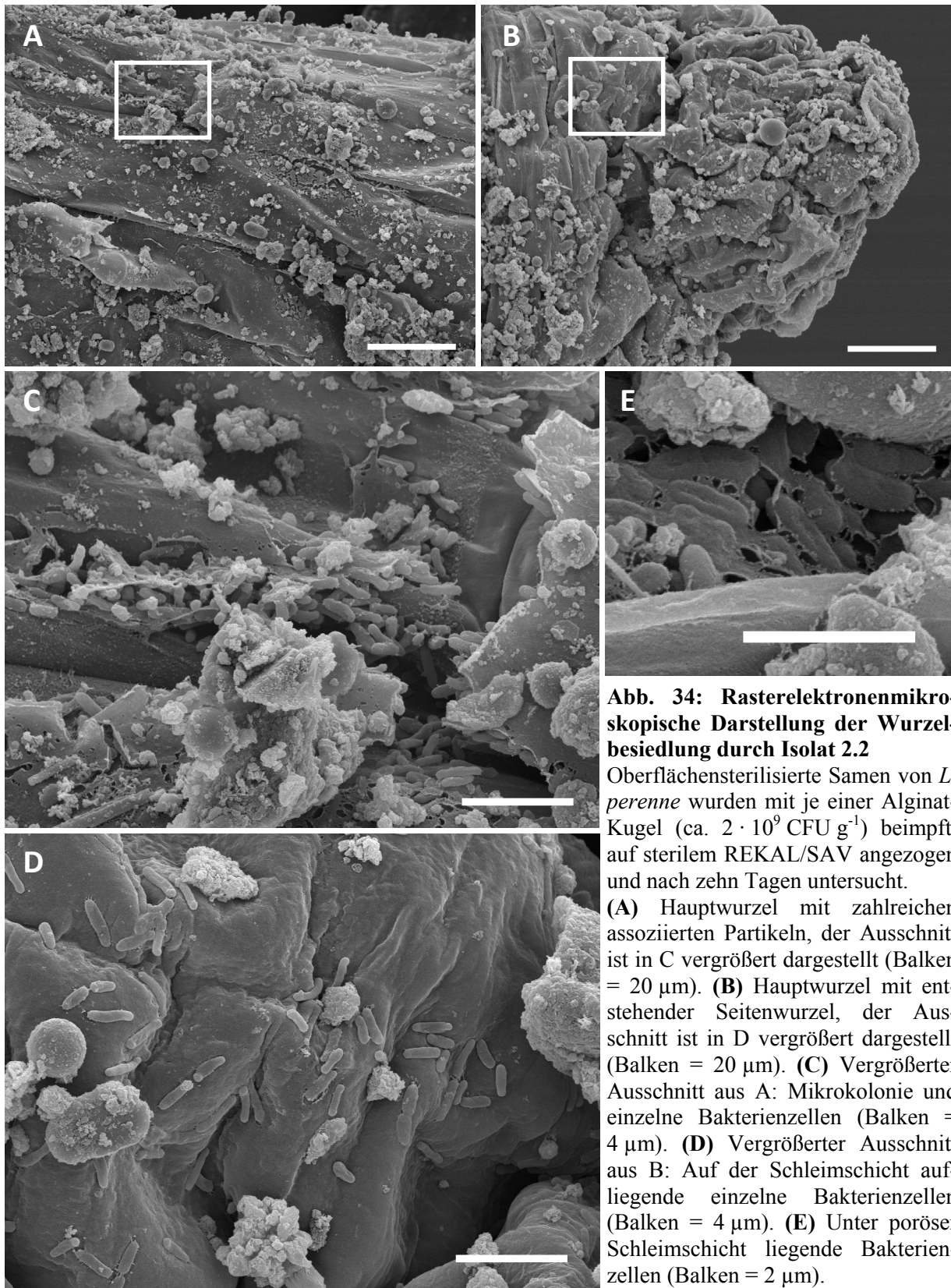
In der fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchung zeigten sich die Zellen des markierten Isolats 2.2 (pSM1890) auf den Wurzeln einzeln verstreut und auch in kleineren und größeren Mikrokolonien, wobei diese sich in einigen Fällen auch lang gestreckt darstellten (Abb. 33 A). Insbesondere diese zum Teil auch über mehrere hundert Mikrometer in die Länge gezogenen Kolonien konnten oftmals in den Vertiefungen zwischen einzelnen Rhizodermiszellen beobachtet werden. Kleinere Mikrokolonien fanden sich auch an der Basis von Seitenwurzeln, die sich von der Hauptwurzel abzweigten (Abb. 33 B). An Wurzelhaaren konnten keine Bakterien beobachtet werden.

Insgesamt waren die Wurzeln unterschiedlich stark von den Bakterien besiedelt: manche Pflanzen wiesen eine mehr oder weniger durchgängige Verteilung mit markierten Zellen bis hin zu einer stark besiedelten Wurzelspitze auf (Abb. 33 C). Andere Wurzeln hingegen waren nur an der Basis unterhalb der Schnittkante von Zellen besiedelt, zur Wurzelspitze hin ließen sich dann allerdings nur noch vereinzelt Zellen auffinden. Manche Wurzeln wiesen sogar an der Basis kaum Bakterien auf. Dieses heterogene Besiedlungsverhalten zeigte sich sowohl auf durchweg gegossenen als auch auf den über mehrere Wochen ausgetrockneten Pflanzen. Hier waren teilweise die Wurzeln stark mit Zellen des Isolats besiedelt (Abb. 33 D), teilweise lagen jedoch auch nur wenige markierte Bakterien vor.

3.9.2 Rasterelektronenmikroskopie

An etwa fünf Tage alten Keimlingen von *Lolium perenne*, die in autoklaviertem REKAL/SAV angezogen und bei Aussaat pro Samenkorn mit je einer Alginat-Kugel von Isolat 2.2 (mit ca. $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹) inokuliert wurden, zeigte sich bei der rasterelektronen-mikroskopischen Untersuchung zunächst die sehr heterogene Oberfläche der Wurzeln mit assoziierter Schleimschicht und auch Substratpartikeln (Abb. 34 A, B).

Bei genauerer Betrachtung ließen sich sowohl Einzelzellen als auch Mikrokolonien des Isolats entdecken, die jeweils entweder auf der Schleimschicht auflagen (Abb. 34 C, D) oder auch unter ihr verborgen waren und nur an Stellen mit aufgerissener Schicht ausgemacht werden konnten (Abb. 34 E). Auf Wurzelhaaren ließen sich keine Bakterienzellen auffinden und ebenso wenig an den Wurzelspitzen.



3.10 Untersuchung des Enzyms ACC Deaminase

3.10.1 Sequenzanalyse

Es ließ sich mittels PCR etwa 1 kb des ACC Deaminase-Gens von Isolat 2.2 amplifizieren, wobei die anschließende Direkt-Sequenzierung des Amplikons eine auswertbare Basenabfolge von 912 bp lieferte (siehe Anhang). Datenbankabgleiche zeigen, dass diese Gensequenz am genauesten mit einem Wert von 98,6% (899 von 912 Basen) mit der des Stamms *Pseudomonas fluorescens* Ps 2-3 (EU520401) übereinstimmt. Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz von insgesamt 303 AS entspricht zu 99,0% (300 von 303 Aminosäuren) der entsprechenden Sequenz des Stamms Ps 2-3. Zu anderen bekannten Gensequenzen zeigte die für Isolat 2.2 ermittelte Sequenz weitaus geringere Übereinstimmungen, wobei der höchste Wert hier mit etwa 87% von den beiden Stämmen *Pseudomonas fluorescens* 2P24 (EF635249) und *Pseudomonas* sp. Ps 7-12 (EU520398) erreicht wird.

3.10.2 Massenspektrometrische Untersuchung

Das extrahierte Gesamtprotein des Isolats 2.2, das sowohl unter normalen Bedingungen als auch mit ACC als einziger Stickstoffquelle angezogen wurde, ist in Abb. 35 elektrophoretisch aufgetrennt zu sehen. Die markierten Gelbände oberhalb von 35 kDa (schwarzer Pfeil) sowie die entsprechende Region im gegenüberliegenden Ansatz ohne ACC wurden massenspektrometrisch untersucht. Die jeweils ersten sechs Ergebnisse des Datenbankabgleichs der Trypsin-Fragmente beider Ansätze sind in Tab. 16 und Tab. 17 aufgelistet.

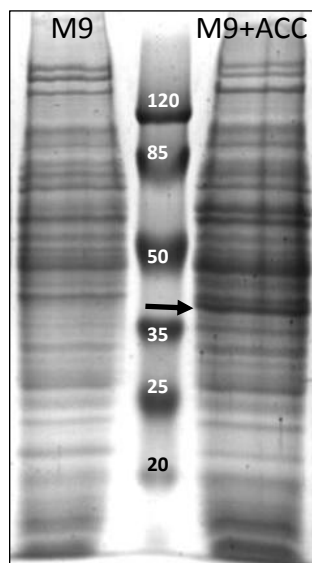


Abb. 35: Gesamtprotein des Isolats 2.2 mit ACC als Stickstoffquelle

Dargestellt ist das elektrophoretisch aufgetrennte und mit Coomassie gefärbte Gesamtprotein des Isolats 2.2, das in normalem M9-Medium (links) und M9-Medium mit 3 mM ACC als einziger Stickstoffquelle (rechts) für 24 h inkubiert wurde.

Aufgetragen auf ein SDS-Gel (12%) wurden je 5 µl Proteinlösung sowie 5 µl des Prestained Protein Molecular Weight Markers (mittig, mit ungefährender Angabe des Molekulargewichts der Banden in kDa). Markiert (schwarzer Pfeil) ist die Bande mit vermuteter ACC-Deaminase.

Tab. 16: Auswahl der Peptidübereinstimmungen des Ansatzes in Medium ohne ACC

Score	Protein (Organismus)	Accession No.	übereinstimmende Peptide [Anzahl (Anteil)]
265	Ketosäuren-Reduktoisomerase (<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1)	Q3K6T1	13 (33%)
193	Ketosäuren-Reduktoisomerase (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a)	Q4ZY66	8 (18%)
118	Ketosäuren-Reduktoisomerase (<i>Burkholderia cenocepacia</i> AU 1054)	Q1BUZ9	3 (6%)
106	Ketosäuren-Reduktoisomerase (<i>Chromohalobacter salexigens</i>)	Q1R092	4 (5%)
101	Porin F der äußeren Membran (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i>)	P22263	3 (10%)
98	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)	P27726	3 (7%)

Sowohl ohne als auch mit ACC als Stickstoffquelle ließ sich in den untersuchten Gelregionen zum großen Teil das Enzym Ketosäuren-Reduktoisomerase nachweisen (siehe Tab. 16 und Tab. 17). Im Ansatz mit ACC zeigte sich zudem eine 34%ige Übereinstimmung der Trypsin-Fragmente mit denen der ACC Deaminase des Stamms *Pseudomonas* sp. 6G5, dessen Enzym ca. 36,9 kDa wiegt. Zu 29% bzw. 25% stimmten die Fragmente mit denen etwa gleich schwerer Enzyme eines anderen *P. fluorescens* bzw. eines *Pseudomonas putida* Stamms überein (siehe Tab. 17).

Tab. 17: Auswahl der Peptidübereinstimmungen des Ansatzes in Medium mit ACC

Score	Protein (Organismus)	Accession No.	übereinstimmende Peptide [Anzahl (Anteil)]
384	Ketosäuren-Reduktoisomerase (<i>Pseudomonas fluorescens</i> Pf0-1)	Q3K6T1	20 (48%)
270	Ketosäuren-Reduktoisomerase (<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>syringae</i> B728a)	Q4ZY66	12 (42%)
268	ACC Deaminase (<i>Pseudomonas</i> sp. 6G5)	P30297	22 (34%)
221	ACC Deaminase (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	Q51813	19 (29%)
207	Ketosäuren-Reduktoisomerase (<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA7)	A6VCE7	11 (29%)
188	ACC Deaminase (<i>Pseudomonas putida</i>)	Q5PWZ8	14 (25%)

3.11 Untersuchungen zum Wirkmechanismus der Wachstumsförderung

Mithilfe des Transposons EZ-Tn5 <KAN-2> sollten Mutanten des Isolats 2.2 ohne ACC Deaminase-Aktivität hergestellt werden. Nach der Elektroporation hatten etwa $4 \cdot 10^3$ der behandelten Zellen das Transposon aufgenommen und ließen sich selektiv anzüchten. Von den 384 zufällig gewählten Mutanten zeigten vier kein Wachstum mehr im M9-Medium mit ACC als einziger Stickstoffquelle: diese wurden als 2.2.Tn5.A, 2.2.Tn5.B, 2.2.Tn5.C und 2.2.Tn5.D bezeichnet. Der Versuch, mittels Direkt-Sequenzierung die Insertionsregion des Transposons bei den vier Mutanten zu bestimmen, schlug in allen Fällen fehl.

In einer genaueren Untersuchung des Wachstums dieser Stämme zeigten sich alle vier nicht mehr dazu in der Lage, in normalem M9-Minimalmedium zu wachsen. In 50%igem API AUX-Medium mit 10 mg ml^{-1} Glucose zeigten die Mutanten stark vermindertes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp (ohne Abb.). Eine PCR zur Amplifikation des ACC Deaminase-Gens lieferte bei jeder der Mutanten das dem Wildtyp entsprechende Amplikon von ca. 1 kb. In Standard-I-Nährmedium mit Zusatz von 1 mM L-Tryptophan produzierten alle mutierten Stämme weniger Auxine als der Wildtyp 2.2, wobei sich die Konzentration der gebildeten Phytohormone nicht signifikant ($p > 0,05$) von der Konzentration unterschied, die der Wildtyp ohne zusätzliches Tryptophan im Medium erreicht (siehe Abb. 36). Auf CAS-Agarplatten zeigten bis auf den Stamm 2.2.Tn5.A alle Transposon-Mutanten ähnliches Wachstum und eine vergleichbar starke Siderophoren-Bildung wie der Wildtyp nach 48 h. 2.2.Tn5.A hingegen konnte weder wachsen noch Siderophoren produzieren.

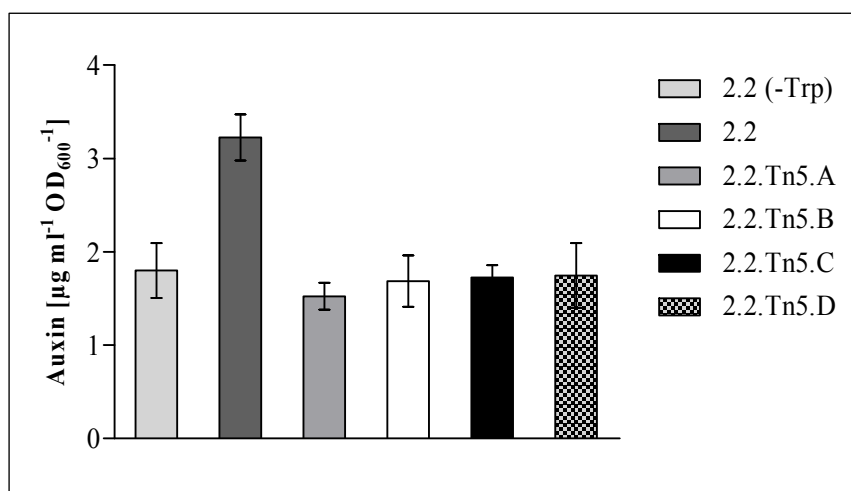


Abb. 36: Auxin-Synthese der Transposon-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp

Dargestellt ist die von Wildtyp 2.2 und den Mutanten synthetisierte Menge an Auxin (normalisiert auf die Zelldichte). Hierfür wurden 20 ml Standard-I-Nährmedium (bis auf den ersten Ansatz zusätzlich mit 1 mM L-Tryptophan) mit 10^8 CFU inokuliert und bei 140 rpm und 28°C für 48 h inkubiert. Der Auxin-Nachweis erfolgte über Anfärbung des zellfreien Überstands mit Salkowski-Reagenz ($n=3$).

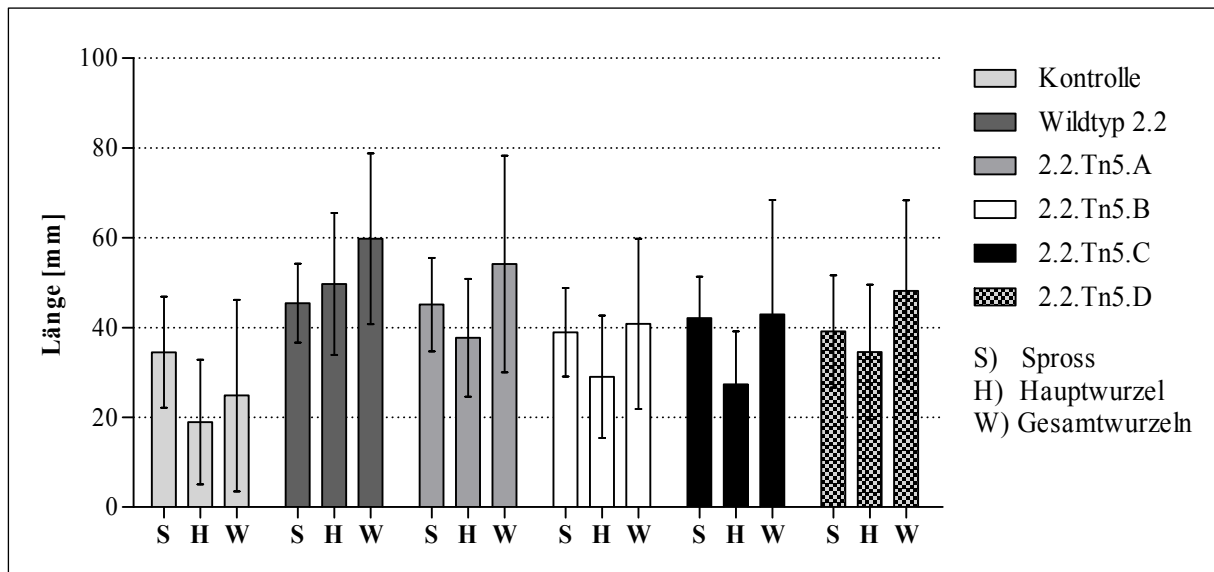


Abb. 37: Einfluss der Transposon-Mutanten auf das Wachstum von *L. perenne*

Dargestellt ist das Längenwachstum von *L. perenne*, aufgeteilt in Spross (S), Hauptwurzel (H) und Summe der Längen von Haupt- und Seitenwurzeln (W). Oberflächensterilisierte Samen wurden für 10 d auf sterilem Filterpapier in Petrischalen mit 5 ml A. bidest (Kontrolle) bzw. Suspensionen mit einer Zelldichte von ca. 10^7 CFU ml⁻¹ angezogen ($n \geq 17$).

Der *in vitro* Einfluss der vier Mutanten auf das Wachstum von Keimlingen des Deutschen Weidelgrases ist in Abb. 37 zu sehen. Bei einer Zelldichte von etwa 10^7 CFU pro Milliliter förderte der Wildtyp des Isolats 2.2 nach 10 d signifikant ($p < 0,01$) das Wachstum vom Spross und hoch signifikant ($p < 0,001$) das der Wurzeln (siehe Tab. 18). Zwar erhöhten alle vier Mutanten die durchschnittliche Länge der Pflanzenteile, eine statistische Auswertung wies jedoch nur bei manchen der Stämme signifikante Effekte nach. Mutante 2.2.Tn5.A zeigte hier den gleichen Einfluss auf das Pflanzenwachstum wie der Wildtyp-Stamm, die Mutante 2.2.Tn5.B hingegen hatte bei keinem der Pflanzenteile eine signifikante Auswirkung auf das Wachstum im Vergleich zur Kontrolle ($p > 0,05$). Die Stämme 2.2.Tn5.C und 2.2.Tn5.D zeigten nur noch auf das Wurzelwachstum bezogen signifikante Einflüsse.

Tab. 18: Dunnett-Test des Pflanzenversuchs mit Transposon-Mutanten

Vergleich	Spross	Haupt- wurzel	Gesamt- wurzeln
Kontrolle vs. Wildtyp 2.2	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Kontrolle vs. 2.2.Tn5.A	$p < 0,01$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Kontrolle vs. 2.2.Tn5.B	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p > 0,05$
Kontrolle vs. 2.2.Tn5.C	$p > 0,05$	$p > 0,05$	$p < 0,05$
Kontrolle vs. 2.2.Tn5.D	$p > 0,05$	$p < 0,01$	$p < 0,01$

4. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, Möglichkeiten zur mikrobiellen Unterstützung der Begrünungsmaßnahmen der Rückstandshalde Sigmundshall zu untersuchen.

Wie Abb. 38 zusammenfassend aus den hier durchgeführten Gewächshausversuchen verdeutlicht, ist das Abdecksubstrat REKAL/SAV kein idealer Bodenersatz zur Anzucht von Pflanzen. Zwar kann durch Zugabe von Mineraldünger der Ertrag um über 60% gesteigert werden, im Vergleich zu einem normalen Ackerboden ist das Wachstum der Pflanzen (hier Deutsches Weidelgras, *Lolium perenne*) jedoch stark vermindert. Durch diese Einschränkung im Wuchs wird auch die Evapotranspirationsleistung der pflanzlichen Deckschicht und somit die Reduktion des Haldenwassers verringert. Die Wachsminderung kann begründet sein in den eingangs bereits beschriebenen Eigenschaften des technogenen Abdecksubstrats (vgl. Abschnitt 1.1.3), wie z.B. den Gehalten an verschiedenen Schwermetallen. Sicherlich spielt aber auch die Festlegung des verabreichten Phosphatdüngers im Substrat eine große Rolle.

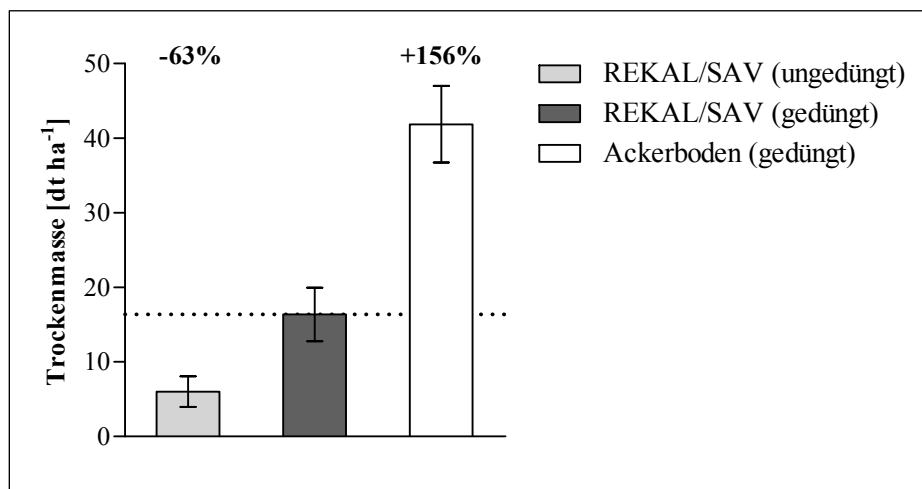


Abb. 38: Wachstum von *Lolium perenne* auf verschiedenen Substraten

Dargestellt ist die aus allen Gewächshausversuchen gemittelte, getrocknete oberirdische Biomasse von *L. perenne*, das für ca. 100 d auf teilweise gedüngtem REKAL/SAV und Ackerboden angezogenen wurde ($n \geq 5$). Ertragssteigerungen und -minderungen (in %) beziehen sich auf den gedüngten Ansatz in REKAL/SAV (gestrichelte Linie). Gedüngt wurde mit Kalkammonsalpeter und Tripelphosphat und mit NPK-Volldünger.

Bakterien mit pflanzenwachstums-fördernden Eigenschaften könnten hier Hilfestellung bei den Begrünungsmaßnahmen leisten, da derartige Mikroorganismen nachweislich unter anderem sowohl bei der Bereitstellung von Phosphaten aus dem Boden helfen können (Rodríguez & Fraga 1999), als auch die negativen Effekte verschiedener phytotoxischer Schwermetalle vermindern können (Glick et al. 2007) (vgl. auch Kapitel 1.2).

4.1 Isolierung und Charakterisierung der Rhizobakterien

4.1.1 Hintergrund der Probenahmen

Als erster Schritt der Bemühungen erfolgten *in situ* Probenahmen, d.h. es wurden Bakterienstämme direkt aus der Rhizosphäre von Weidelgraspflanzen isoliert, die bereits auf der Rückstandshalde Sigmundshall ansässig waren. Eine solche Vorgehensweise sollte sicher stellen, dass die im weiteren Verlauf der Untersuchungen genutzten Bakterien den Selektionsdruck des technogenen Abdecksubstrats mit seinem hohen pH-Wert, den verschiedenen Schwermetallen usw. am ehesten bewältigen können. Grandlic et al. (2008) gingen in ihren Arbeiten zur bakteriellen Unterstützung der Phytostabilisation von sauren und stark Zink- und Blei-haltigen Abraumhalden in Texas und Mexiko ähnlich vor. Das Vorhandensein einer Vielzahl an Bakterienarten im Abdecksubstrat der Halde Sigmundshall konnte bereits vorher von Majewski (2005) bestätigt werden: an begrünten Standorten der Halde (aber in wurzelfreiem Substrat) zeigten sich z.B. zwischen 10^8 und 10^9 Gesamtzellen und zwischen 10^3 und 10^6 CFU pro Gramm Boden. Unter den von Majewski (2005) im Labor kultivierten Bodenisolaten fanden sich u.a Vertreter der Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Ralstonia* und *Moraxella* sowie zahlreiche nicht genauer charakterisierte Bakterien.

Die während der vorliegenden Arbeit durchgeführte Isolation der Bakterien direkt aus der Rhizosphäre sollte die Wahrscheinlichkeit erhöhen, dass die Stämme dieses Habitat nach der Inokulation der Pflanzen auch wieder erfolgreich besiedeln können. Eigene Arbeiten haben bereits gezeigt, dass sich z.B. der Stamm S06, ein *Pseudomonas*-Isolat aus undurchwurzelter Abdecksubstrat der Halde Sigmundshall, *in vitro* u.a. durch Phosphatsolubilisierung und Auxin-Produktion als potentiell wachstumsfördernd auszeichnete. Im Gewächshausversuch besaß jener Stamm aber nicht die Fähigkeit, die Wurzeln von *Lolium perenne* erfolgreich zu besiedeln und konnte somit wahrscheinlich auch keinen nachweisbaren Einfluss auf das Wachstum der Gräser nehmen (Koch 2007).

Durch Nutzung eines Mediums wie NBRIP (Nautiyal 1999), das die Fähigkeit zur Phosphatsolubilisierung bei Mikroorganismen anzeigt, sollte in der vorliegenden Arbeit bei der Isolierung der Rhizobakterien von Anfang an die Problematik der Phosphat-Fixierung im Abdecksubstrat in den Vordergrund gestellt werden. Hierbei wurden die Rhizosphärenisolate, die nach zwei Wachstumsphasen auf NBRIP-Medium nicht oder nur sehr langsam auf einem Komplexmedium wie Standard-I-Nährmedium anwuchsen (Isolate 2.13, 2.15, 2.17, 2.24, 2.25 und 2.26), nicht weiter untersucht, da diese Tatsache die folgenden Arbeiten unnötig erschwert hätte. Die Optimierung der Kultivierungsbedingungen einzelner Bakterienstämme

kann ein zeitaufwändiger Prozess sein (Majewski 2005) und war kein Ziel der vorliegenden Arbeit. Langsames Wachstum könnte zudem die Etablierung der jeweiligen Stämme in der Rhizosphäre erschweren, wenn sich vielleicht andere autochthone Mikroorganismen durch schnellere Teilungsfähigkeit besser in der ökologischen Nische ansiedeln können (Simons et al. 1996, Dekkers et al. 1998). Außerdem würden Prozesse wie beispielsweise das Herstellen der Alginat-Kugeln oder die Sameninokulation unnötig verlangsamt werden.

4.1.2 Erste Untersuchungen der Isolate

Zur Beurteilung der isolierten Rhizobakterien erfolgte zunächst eine einmalige, exemplarische Quantifizierung der Phosphatsolubilisierungs-Leistung, anhand derer die Isolate 1.14, 1.18, 2.16 und 2.20 in Hinblick auf die Düngeproblematiken bei der Haldenbegrünung als unzureichend eingestuft und nicht weiter bearbeitet wurden. Bei dieser ersten Untersuchung zur Solubilisierung wurde eine Inokulation ohne definierte Zellzahl vorgenommen, um den Arbeitsaufwand zu verringern. Vorherige Arbeiten (Koch 2007) haben gezeigt, dass sich zwar Unterschiede dabei ergeben, ob nur eine einzelne Kolonie oder eine definierte Zellzahl zur Inokulation des NBRIP-Mediums genutzt wird. Bei den zehn dort untersuchten *Pseudomonas*-Isolaten zeigten die Ansätze mit Kolonie-Inokulation jedoch nur maximal halb so viel gelöstes Phosphat, bei manchen der Isolate brachten beide Methoden sogar identische Ergebnisse. Es war daher sehr wahrscheinlich, dass das Isolat 1.18 mit $77 \mu\text{g ml}^{-1}$ gelöstem Phosphat auch bei definierter Inokulation den Vergleich zu den effizienteren Isolaten mit Konzentrationen zwischen 303 und $984 \mu\text{g ml}^{-1}$ Phosphat nicht standhalten können würde. Die Isolate 1.14, 2.16 und 2.20, die im Flüssigmedium keine nennenswerten Mengen von Phosphat lösen konnten, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Zwar zeigten diese Isolate anfangs auf den Agarplatten klare Höfe und somit Anzeichen für die Fähigkeit zur Phosphatsolubilisierung, anscheinend haben sie aber diese Fähigkeit im Laufe der Laborphase verloren. Illmer & Schinner (1992) berichten von ähnlichen Beobachtungen bei der Isolierung von phosphatsolubilisierenden Mikroorganismen. Igual et al. (2001) empfehlen daher sogar, nach fünf und mehr Überimpfungen die Stabilität der Phosphatsolubilisierung zu überprüfen. In der vorliegenden Arbeit wurden mit drei Überimpfungen insgesamt weniger Schritte gewählt, damit durch diese verlängerte Laborphase nicht eventuell noch andere, vielleicht für die weitere Arbeit wichtige Attribute der Bakterien beeinträchtigt werden.

Die von den übrigen Isolaten gelösten Mengen an Phosphat liegen in ähnlichem Rahmen wie die Mengen anderer Untersuchungen. Der Stamm *Pseudomonas* sp. NBRI 4014 konnte nach 7 d beispielsweise $277 \mu\text{g ml}^{-1}$ in Lösung bringen (Gupta et al. 2002), und vier nicht weiter

beschriebene Isolate aus alkalischen Böden in Nord-Indien lösten zwischen 200 und 450 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nach dreitägiger Inkubation in 10 ml NBRIP (Nautiyal et al., 2000). In eigenen Untersuchungen konnten zehn *Pseudomonaden* nach etwa 3 d zwischen $271,0 \pm 30,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ und $729,5 \pm 51,1 \mu\text{g ml}^{-1}$ Phosphat aus der gleichen Menge ungepufferten Mediums lösen (Koch 2007). Eine verlängerte Inkubation von 7 d mit zusätzlicher täglicher Messung der gelösten Phosphatmenge bei drei der zehn Stämme zeigte jedoch, dass bereits nach 2-3 d kaum weiteres Phosphat mehr in Lösung gebracht wurde und ein weiterer Konzentrationsanstieg eher auf die Verdunstung des Wasseranteils im Medium und die einhergehende Verringerung des Ansatzvolumens zurückzuführen sein dürfte (Koch 2007).

Die Siderophorenproduktion der isolierten Rhizobakterien wurde über das universelle Nachweisverfahren nach Schwyn & Neilands (1987) überprüft. Trotz der antimikrobiellen Eigenschaften, die dem hierbei genutzten Detergens HDTMA zugesprochen werden (Schwyn & Neilands 1987, Alexander & Zuberer 1991), vermochten alle untersuchten Isolate auf dem eingesetzten CAS-Agar zu wachsen und durch Siderophorenproduktion Eisen aus dem Medium zu akquirieren.

Die weiteren Untersuchungen der isolierten Bakterienstämme wie z.B. die mikroskopische Charakterisierung, die Bestimmung des Gram-Verhaltens sowie der Nachweis der Fluoreszenz auf *Pseudomonas* F-Agar deuten darauf hin, dass es sich mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit bei allen untersuchten Stämmen um Angehörige des Genus *Pseudomonas* handelt. Da *Pseudomonaden* als häufige Bodenbakterien beschrieben sind (Moore et al. 2006) und auch neben der Gattung *Bacillus* zu den effizientesten bakteriellen Phosphat-solubilisierern gehören (Tilak et al. 2005), scheint das gehäufte Auftreten dieser Bakterien in den ausgewählten Proben nahe liegend. Weil *Pseudomonaden* zudem als anspruchslose Mikroorganismen charakterisiert sind (Moore et al. 2006), erklärt sich auch die Dominanz dieser Gattung unter den auf NBRIP isolierten Stämmen. Dieses Medium kann als Minimalmedium bezeichnet werden, da es neben einigen Salzen nur über Glucose als Kohlenstoffquelle verfügt und z.B. im Gegensatz zum ähnlichen PVK-Medium nach Pikovskaya keinen Hefeextrakt als komplexere Nährstoffquelle enthält (Nautiyal 1999). Das NBRIP-Medium wurde jedoch gewählt, da es die Fähigkeit zur Phosphatsolubilisierung bei Mikroorganismen besonders deutlich erkennen lässt (Nautiyal 1999).

In diesem Zusammenhang kann auch eine von Browne et al. (2009) erstellte Hypothese erwähnt werden. Die Autoren vermuten, dass gerade in phosphat-armen Böden vermehrt *Pseudomonaden* mit der Fähigkeit zur Phosphatsolubilisierung zu finden sein müssten, da diese Böden wahrscheinlich einen Selektionsdruck ausüben. Goldstein et al. (1999) konnten

zudem belegen, dass in solchen Böden symbiotische Beziehungen zwischen Pflanzen und phosphatsolubilisierenden Bakterien auftreten können. Dieses Phänomen könnte durchaus auch beim Abdecksubstrat der Halde Sigmundshall denkbar und ein weitere mögliche Erklärung sein für die Überzahl an solubilisierenden Pseudomonaden unter den in der vorliegenden Studie gefundenen Isolat.

Hierzu muss aber auch angemerkt werden, dass sicherlich durch die Wahl anderer Kultivierungsbedingungen (z.B. verschiedener Nährstoffangebote und auch Inkubationstemperaturen) ein größeres Spektrum an unterschiedlichen Mikroorganismen und hierbei auch PGPR hätte isoliert werden können. Der Fokus der Studie lag jedoch nicht in der Darstellung der mikrobiellen Gemeinschaft oder der Vielfalt an Pflanzenwachstums-Förderern im Abdecksubstrat bzw. in der Rhizosphäre. Einzig die praxisnahe Isolierung von phosphatsolubilisierenden Bakterien, die zur Unterstützung der Begrünungsmaßnahmen eingesetzt werden sollten, stand im Vordergrund. Erste Untersuchungen zur mikrobiellen Gemeinschaft im Abdecksubstrat bzw. auch direkt in der Rhizosphäre von dort ansässigem *Lolium perenne* wurden hingegen bereits mittels kultur-abhängiger (Majewski 2005) bzw. kultur-unabhängiger Methoden (Dratwinski 2010) durchgeführt.

4.1.3 Auswahl und weitere Untersuchung geeigneter Isolate

Ein wichtiges Auswahlkriterium, durch das das Kollektiv von phosphatsolubilisierenden Bakterien im weiteren Verlauf der Untersuchungen reduziert wurde, war der Nachweis der Produktion des Enzyms ACC Deaminase. Durch diese metabolische Eigenschaft könnten die Rhizobakterien den pflanzenwachstums-hemmenden Effekten verschiedenster Faktoren entgegenwirken (Glick et al. 2007), wie z.B. der von Niessing (2005) beschriebenen vereinzelt hohen Salinität des entsalzten Abdecksubstrats, dem Vorhandensein verschiedener Schwermetalle (Tab. 1) oder auch der teilweise auf dem Südhang der Rückstandshalde auftretenden Trockenperioden mit hohen Temperaturen im Substrat. Insgesamt zeigten ein Isolat der ersten Probenahme (1.8) und sieben der zweiten Probenahme (Isolate 2.2, 2.5, 2.8, 2.18, 2.19, 2.22 und 2.23) Wachstum mit ACC als einziger Stickstoffquelle, was auf entsprechende Enzym-Aktivität schließen lässt.

Angesichts der Tatsache, dass sich diese Rhizosphärenisolate der zweiten Probenahme zum Teil in den Bandenmustern der *fingerprint*-PCR sehr stark ähnelten, sollte vorzugsweise bei zukünftigen Bemühungen jeweils nur ein Isolat pro Probenahme bzw. pro Wurzelprobe gewonnen werden, um damit die Gefahr der Klonisolierung zu verringern (Penrose & Glick 2003, Govindasamy et al. 2008). Da Vyas et al. (2009) aber zeigen konnten, dass zwei von

ihnen untersuchte *Pseudomonas*-Isolate trotz hoher Ähnlichkeit im Bandenmuster der ERIC-PCR ein unterschiedliches Vermögen zur Phosphatsolubilisierung unter Stressbedingungen zeigten, wurden dennoch in der vorliegenden Studie die ersten drei Isolate der zweiten Probenahme (Isolate 2.2, 2.5 und 2.8) in die weiteren Untersuchungen mit einbezogen.

Die *Pseudomonaden*-spezifische PCR nach Widmer et al. (1998) erzeugte bei allen vier Isolaten ein Amplikon von etwa 990 bp. Die Direkt-Sequenzierung der Amplikons ergab eine vollständige Übereinstimmung der Basenabfolge bei den Stämmen 2.2, 2.5 und 2.8 über den ermittelten Bereich von etwa 800 bp (einschließlich gleicher Position mit überlagerten Basen). Isolat 1.8 unterschied sich von den restlichen Stämmen in dieser einen Position durch Vorhandensein einer einzelnen Base. Der anschließende Datenbankabgleich der Sequenzen bestätigte die Zugehörigkeit zum Genus *Pseudomonas* und ist somit auch in Einklang mit den vorherigen Charakterisierungs-Ergebnissen und auch den Resultaten des API 20 NE-Tests, der alle vier Stämme mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit dem Genus zuweist.

Da dieser API-Test jedoch hauptsächlich für den klinischen Bereich konzipiert wurde und somit eher pathogene Keime wie z.B. *Pseudomonas aeruginosa* anstatt Umweltisolate nachzuweisen vermag, soll die hiernach ermittelte Zuweisung der Isolate zur Spezies *P. fluorescens* nur als Anhaltspunkt gewertet werden. Das Auswertungsschema unterscheidet nur wenige Spezies der Gattung *Pseudomonas*, und Vergleichsstudien (Bosshard et al. 2006) haben belegt, dass z.B. die Bestimmung der 16S rDNA-Sequenz genauere Auskunft über die Gattungs- und Spezieszugehörigkeit von klinischen Isolaten bietet als das System des Typs API (und auch das des Typs VITEK[®], siehe auch Abschnitt 4.3.2). Dennoch kann das im Test nachgewiesene biochemische Profil auch Grundlage für die Einteilung von *Pseudomonas*-Isolaten in verschiedene phänotypische Cluster bieten (Wang & Jayarao 2001).

Durch die vier intensiver untersuchten Rhizosphären-Isolate konnten aus 20 ml des ungepufferten NBRIP-Mediums bei Inokulation mit definierter Zellzahl zwischen $430 \pm 21 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 2.2) und $484 \pm 58 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 1.8) Phosphat in Lösung gebracht werden. Johri et al. (1999) konnten in 40 ml NBRIP bei 18 Isolaten nach 7 d gelöste Phosphatwerte zwischen 36 und $440 \mu\text{g ml}^{-1}$ messen. Gulati et al. (2008) untersuchten die Solubilisierung von TCP bei zwölf fluoreszierenden *Pseudomonaden*, wofür je 50 ml NBRIP genau wie in der vorliegenden Untersuchung angeimpft und 5 d bei 28°C und 180 rpm inkubiert wurden. Dabei konnten Werte zwischen 319 und $805 \mu\text{g ml}^{-1}$ gemessen werden.

Mit 50 mM Tris HCl im Medium wurden in der vorliegenden Studie zwischen $467 \pm 14 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 2.8) und $484 \pm 23 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 1.8) gelöst, wobei diese Werte im ähnlichen Bereich wie die des ungepufferten Mediums liegen. Browne et al. (2009) deuten an,

dass bei ihren Bemühungen zur Isolierung von solubilisierenden *Pseudomonaden* eine leichte Pufferung des NBRIP-Mediums mit 25 mM Tris HCl und Einstellen des pH-Werts auf 8,1 das "Erkennen" der Phosphatsolubilisierung "verbessert", was eine stärkere Lösung des Phosphats implizieren würde. In jener Veröffentlichung wurden aber auch nur Agarplatten und kein Flüssigmedium zur Beurteilung der Solubilisierungsfähigkeit genutzt.

Bei Pufferung mit 100 mM Tris HCl lösten die in der vorliegenden Studie untersuchten Isolate nur etwa halb so viel Phosphat wie im ungepufferten Medium, wobei die Spanne von $207 \pm 32 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 2.5) bis zu $216 \pm 41 \mu\text{g ml}^{-1}$ (Isolat 1.8) reichte. Joseph & Jisha (2009) bestimmten die Solubilisierungsleistung einiger Rhizosphären-Isolate in jeweils 50 ml PVK-Flüssigmedium, das auch teilweise mit 100 mM Tris HCl gepuffert wurde. Nach 14 d Inkubation konnte bei einigen Stämmen im gepufferten Ansatz ebenfalls nur halb so viel Phosphat gemessen werden wie im ungepufferten Medium: Isolat PSB 73 beispielsweise (identifiziert als *Pseudomonas gladioli*) löste ohne Pufferung $616 \pm 27 \mu\text{g ml}^{-1}$ und mit 100 mM Tris HCl nur $315 \pm 15 \mu\text{g ml}^{-1}$ Phosphat. In derselben Studie zeigten sich aber auch teilweise Stämme kaum von der Pufferung beeinflusst.

Insgesamt muss angemerkt werden, dass die Solubilisierungs-Leistung der vier untersuchten Isolate auffallend ähnlich ist (vgl. Abb. 10), was wiederum auf eine nahe Verwandtschaft hindeuten könnte. Die Betrachtung der von den Stämmen synthetisierten Auxin-Mengen grenzt aber zumindest das Isolat 1.8 der ersten Probenahme von den anderen Isolaten ab (vgl. Abb. 11). Dieser Stamm konnte innerhalb von 48 h aus der Vorstufe Tryptophan über 30% mehr Auxin synthetisieren als die Isolate der zweiten Probenahme. Dabei lagen die Werte aller vier Stämme ungefähr im Rahmen anderer Literaturangaben. Chang (2007) konnte bei 36 verschiedenen Stämmen Auxin-Konzentrationen bis zu $3,35 \pm 0,09 \mu\text{g ml}^{-1} \text{OD}_{600}^{-1}$ in DF-Minimalmedium mit etwa 2,5 mM L-Tryptophan nachweisen, und der Stamm *Pseudomonas* sp. NBRI 4014 synthetisierte nach 48 h in TSB-Medium aus zugesetztem Tryptophan $5,6 \mu\text{g ml}^{-1}$ Indol-3-Essigsäure (Gupta et al. 2002).

Welche Auswirkungen die hier *in vitro* nachgewiesenen PGPR-Eigenschaften der Isolate letztlich auf das Pflanzenwachstum *in vivo* haben und ob die Stämme für die Rekultivierungsmaßnahmen der Rückstandshalde Sigmundshall geeignet sein könnten, wurde zunächst in Gewächshausversuchen überprüft.

4.2 Beurteilung der Rhizobakterien anhand von Pflanzenversuchen

Die Experimente im Gewächshaus wurden in der vorliegenden Arbeit hauptsächlich mit entsalztem REKAL/SAV als Substrat durchgeführt, um die Gegebenheiten der Rückstandshalde Sigmundshall am ehesten nachzuempfinden. Als Versuchspflanze diente generell das Deutsche Weidelgras (*Lolium perenne*), da es auch bei der Rekultivierung der Halde als Pionier- und Ammenpflanze zur Erstbegrünung neu abgedeckter Haldenabschnitte dient (Niessing 2005). Grandlic et al. (2009) raten dazu, Pflanzenexperimente mit PGPR möglichst unter den Bedingungen ablaufen zu lassen, unter denen die Bakterien dann auch später eingesetzt werden sollen.

Bei der Beurteilung der hier durchgeführten Gewächshausversuche sollen im Folgenden nur die Trockenmassen besprochen werden, da diese im Gegensatz zu Frischmassedaten besser untereinander und auch mit anderen Arbeiten vergleichbar sind (Bashan & de-Bashan 2005b).

4.2.1 Qualitativer Vergleich der drei Gewächshausexperimente

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse der drei Gewächshausversuche beurteilen zu können, sollen diese zunächst untereinander anhand der Parameter des eingesetzten Abdecksubstrats und des Ertrags der unbeimpften Kontrolle gegenübergestellt werden. Hierbei zeigen sich teilweise bereits gravierende Unterschiede: Wohingegen der erste und zweite Versuch jeweils ähnliche oberirdische Trockenmassen aufwiesen ($15,10 \pm 1,28$ bzw. $15,57 \pm 2,52$ dt ha⁻¹), lieferte der dritte Versuch eine höhere durchschnittliche Biomasse in der Kontrolle, wenn auch hier die größte Streuung vorlag ($19,20 \pm 5,66$ dt ha⁻¹). Die Anzahl der durchgeführten Düngungen sollte hierbei keine Rolle gespielt haben, da der erste Gewächshausversuch insgesamt nur zweimal gedüngt wurde, die beiden anderen hingegen dreimal. Im dritten Versuch wies das eingesetzte Abdecksubstrat jedoch einen um etwa 10% höheren durchschnittlichen Phosphor-Gehalt auf (siehe Tab. 19), was in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein könnte (vgl. Abschnitt 4.3.2).

Entgegen des hier festgestellten Trends zeigte die ungedüngte Kontrolle des ersten Versuchs $6,72 \pm 2,63$ dt ha⁻¹ Trockenmasse, die ebenfalls ungedüngten Gräser des dritten Versuchs hingegen eine geringere Masse von $5,12 \pm 0,50$ dt ha⁻¹. Allerdings liegen auch bei diesem Vergleich teilweise hohe Schwankungen innerhalb der Varianten vor, welche im ähnlichen Versuchsaufbau bei Scheer (2001) aber auch schon beobachtet werden konnten.

Tab. 19: Parameter des eingesetzten Abdecksubstrats aller drei Gewächshausversuche

Parameter des Substrats	Gewächshausexperiment (Nr.)		
	1	2	3
pH-Wert	8,00 ± 0,06	8,11 ± 0,02	7,96 ± 0,03
elektrische Leitfähigkeit [mS cm ⁻¹]	3,35 ± 0,09	3,71 ± 0,19	3,82 ± 0,10
Anteil an Trockensubstanz (TS) [%]	83,7 ± 0,2	79,2 ± 5,5	87,6 ± 1,2
Stickstoffanteil der TS [%]	0,170 ± 0,008	0,181 ± 0,020	0,180 ± 0,008
Phosphorgehalt [mg pro 100 g TS]	98,6 ± 5,6	97,6 ± 1,7	108,7 ± 2,5
Kaliumgehalt [mg pro 100 g TS]	208,7 ± 11,4	124,1 ± 3,9	147,4 ± 7,9
Magnesiumgehalt [mg pro 100 g TS]	536,5 ± 10,0	641,1 ± 18,9	625,3 ± 33,4
Chlorgehalt [mg pro 100 g TS]	43,8 ± 0,5	22,3 ± 0,8	35,9 ± 3,9

Die in fast allen Varianten der drei Experimente beobachteten hohen Fluktuationen könnten durch das teils ungleichmäßige Wachstum der Gräser begründet sein, denn wie die ebenfalls durchgeführten *in vitro* Versuche (vgl. Abschnitte 3.8 und 3.11) verdeutlichen, zeigen dort die jeweils knapp 20 Einzelpflanzen pro Ansatz hohe Schwankungen im Längenwachstum der Wurzeln und Sprosse, die übertragen auf die Topfversuche mit Populationen von jeweils etwa 600 Pflanzen (500 Samen wiegen etwa 1 g) zu dem heterogenen Wachstum geführt haben könnten. Ein anderer wichtiger Faktor hierbei ist auch die Keimungsrate der Samen, die die Größe der Topf-Populationen und somit die Biomasse beeinflusst haben könnte. Die Samen der einzelnen Experimente stammten zudem aus verschiedenen Chargen.

Das in den Gewächshausversuchen eingesetzte Substrat mag ein weiterer Faktor sein, der zum heterogenen Gesamtbild beigetragen haben könnte. Zwar wurde das direkt von der Halde gewonnene entsalzte Substrat vor jedem der drei Versuche im Gewächshaus zunächst manuell homogenisiert und dann erst in die Töpfe verteilt, die punktuelle Einbringung von Anteilen mit z.B. höherem Schwermetall- oder vielleicht auch Salzgehalt in manche Gefäße ist aber nicht auszuschließen. Dies hätte dann entsprechend negativen Einfluss auf das Pflanzenwachstum oder die förderlichen Effekte der eingesetzten Isolate im jeweiligen Topf haben können, ist im Nachhinein aber nicht mehr nachvollziehbar. Das aufgeschüttete Gemisch REKAL/SAV wird zudem auch nicht immer im exakt gleichen Verhältnis von 7 : 3 angesetzt (K+S Aktiengesellschaft, pers. Kommunikation), was den Chargenunterschied verstärkt.

Die Jahreszeit der Versuchsphase kann ebenfalls Einfluss auf das Ergebnis von Gewächshausexperimenten nehmen: Kloepper et al. (2007) konnten zeigen, dass PGPR-Stämme der Gattung *Bacillus* teilweise unter kürzerer Photoperiode (8 h) keine Pflanzenwachstums-

Förderung zeigten, bei längerer (12 h) hingegen schon. Der Grund dafür wird von den Autoren in der möglicherweise veränderten Zusammensetzung bzw. Menge an abgegebenen Wurzelexsudaten vermutet, die eine verringerte Wurzelbesiedlung mit sich bringt. Zwar wurden in der vorliegenden Studie der erste und dritte Versuch im Sommer- und der zweite im Winterhalbjahr gestartet, bei Betrachtung der Ergebnisse scheint dies aber auch keine Erklärung für die beobachteten Schwankungen zu sein.

4.2.2 Darstellung der Phosphor-Problematik anhand des ersten Experiments

Im ersten der drei Gewächshausversuche sollten zunächst die vier Isolate 1.8, 2.2, 2.5 sowie 2.8 auf ihre Einflüsse auf das Pflanzenwachstum *in vivo* untersucht werden. Bei Nutzung von je 12 g Alginat-Kugeln pro Topf zeigte das Isolat 2.2 nach der Versuchsdauer von 100 d einen hochsignifikanten Einfluss auf das Wachstum von *Lolium perenne*, wobei eine Trockenmasseerhöhung von über 50% erreicht wurde. Zwar wiesen auch die anderen getesteten Isolate 1.8, 2.5 und 2.8 ein Vermögen zur Steigerung des durchschnittlichen Ertrags um 12-20% auf, jedoch sorgten bei diesen Stämmen die hohen Schwankungen innerhalb der Varianten für insgesamt keine signifikanten Ergebnisse.

Die Nährstoffanalyse der pflanzlichen Trockenmasse (siehe Tab. 9) zeigt, dass die Gräser mit dem Makronährelement Stickstoff ausreichend versorgt waren, da in den einzelnen Varianten ein Gehalt von ca. 3,3-3,9% vorlag, der Mangel an diesem Element aber in einem Bereich unterhalb von 1,5% eingestuft wird (Bergmann 1993). Ein Kaliumgehalt von mehr als 3,0% spricht nach Bergmann & Neubert (1976) für eine hohe Versorgung, die in allen Varianten mit Gehalten zwischen etwa 3,6 und 4,2% gegeben war. Auch Magnesium war mit ca. 0,47-0,57% ausreichend vorhanden, der Mangelbereich wird von denselben Autoren unterhalb von 0,2% angegeben. Einzig die Phosphor-Versorgung der angezogenen Pflanzen war ungenügend, da bei Gehalten zwischen 0,2 und 0,34% von einer niedrigen Versorgung und unterhalb von 0,2% vom Mangel gesprochen wird. Alle Gräser wiesen einen Gehalt von 0,14 bis knapp 0,17% auf, der innerhalb dieses Mangelbereichs liegt.

Diese Nährstoffverteilung findet sich auch in ähnlichem Maße in den mit Mineraldünger behandelten REKAL/SAV-Varianten der beiden anderen Gewächshausexperimente wieder (siehe Tab. 10 und Tab. 11). Lediglich die ungedüngten Gräser des dritten Experiments (3.E und 3.F) wiesen mit 0,05-0,06% einen noch niedrigeren P-Gehalt auf als alle anderen Gräser. Von insgesamt ähnlichen Nährstoffgehalten in der oberirdischen Biomasse von *Lolium perenne* und auch anderen Pflanzen, die auf Abdecksubstrat angezogenen wurden, berichten schon Scheer (2001) und Niessing (2005). Hiervon abweichend stellen sich die Varianten mit

Ackerboden als Substrat (2.K und 2.L) dar: die Gräser zeigen eine mangelhafte Stickstoffversorgung (ca. 1,2% N), dafür aber erhöhte P-Gehalte von etwa 0,27%, was insgesamt in diesem Boden für andere Nährstoffverteilungen spricht und eher auf Stickstoff als limitierenden Faktor hindeutet. Auch die Abdecksubstrat-Ansätze mit untergemischtem Kompost als Dünger zeigen eine bessere P-Versorgung mit etwa 0,22%, und auch Stickstoff ist in ausreichendem Maße in der Biomasse vorhanden.

Tab. 20: Pflanzliche Phosphor-Aufnahme (erster Gewächshausversuch)

a) in der getrockneten oberirdischen Biomasse

Variante	durchschnittlicher P-Gehalt pro Topf ^a [mg]	Differenz zur ungedüngten Kontrolle (1.A) [mg]
1.A	4,08	---
1.B	9,06	4,98
1.C	11,67	7,59
1.D	14,06	9,98
1.E	10,24	6,16
1.F	9,30	5,22

Trotz des festgestellten Phosphor-Mangels in auf REKAL/SAV angezogenen Pflanzen muss jedoch bedacht werden, dass die in der vorliegenden Studie inokulierten Gräser absolut gesehen mehr von dem Nährelement aufnehmen konnten als die unbehandelten (siehe Tab. 20). Die gedüngte Kontrolle des ersten Experiments (1.B) konnte pro Topf im Schnitt etwa 5 mg mehr P in der oberirdischen Biomasse anlegen als die ungedüngte Kontrollvariante 1.A, und die mit Isolat 2.2 beimpfte Variante (1.D) z.B. konnte etwa doppelt so viel des Nährelements aufnehmen. Hält man sich allerdings vor Augen, dass in diesem Gewächshausversuch bei der ersten Düngung 0,59 g Triplephosphat (mit 45% P-Anteil) und bei der zweiten Düngung 0,76 g NPK-Dünger (15% P-Anteil) pro Topf verabreicht wurden, wird die Problematik der Phosphor-Versorgung im Abdecksubstrat deutlich: offensichtlich konnte nur ein Bruchteil des Düngers von den Pflanzen aufgenommen werden, was auf die Fixierung des Phosphats im Substrat hindeutet. Nach Stevenson & Cole (1999) werden teilweise bis zu 90% der Phosphate direkt nach der Düngung in unlöslichen Formen im Boden festgelegt und stehen den Pflanzen nicht mehr zur Verfügung, wobei dort "normale" Böden betrachtet wurden.

Zwar wurden hier nur die oberirdischen Pflanzenteile geerntet und auf ihre Nährstoffgehalte untersucht, in einer Studie von Chen et al. (2002) jedoch zeigte *Lolium perenne* nach 60 d auf

zwei unterschiedlichen Böden in der ober- und der unterirdischen Biomasse jeweils ähnliche P-Gehalte. Im ersten Substrat wiesen Wurzeln und Sprosse Werte von 0,16 bzw. 0,17% P auf, im zweiten Substrat lagen die Werte bei 0,13 bzw. 0,14% und liegen somit in beiden Fällen auch in dem Mangelbereich, der in der vorliegenden Studie ermittelt wurde. Berücksichtigt werden müssen hierbei allerdings auch die vereinzelt sehr hohen Schwermetallkonzentrationen des Abdecksubstrats REKAL/SAV. Oberländer & Roth (1978) konnten bei Gerstenkeimlingen eine teilweise stark verminderte Aufnahmefähigkeit von Phosphat und Kalium bei Anwesenheit von Schwermetallen wie Kupfer und Blei nachweisen, wobei die Verlagerung der Nährstoffe von der Wurzel in die Sprosse auch mitunter stark inhibiert wurde.

Die hier gewonnenen Ergebnisse legen insgesamt nahe, dass für das Wachstum auf REKAL/SAV das Nährelement Phosphor der limitierende Faktor ist, der nach dem von Liebig'schen Minimumgesetz den Ertrag der Pflanzen bestimmt. Wie den oben beschriebenen Daten zu entnehmen ist, sind selbst ohne zusätzliche Düngung die anderen wichtigen Nährstoffe Stickstoff, Kalium und Magnesium in ausreichender Menge vorhanden, um in der oberirdischen Biomasse der Weidelgräser festgelegt zu werden.

4.2.3 Vergleich und Beurteilung verschiedener Applikationsmethoden

Im zweiten und dritten Gewächshausexperiment ließen sich wichtige Informationen über die Auswirkung einer Beimpfung der Pflanzen mit Isolat 2.2 und die hierfür eingesetzten Methoden gewinnen.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass die im ersten Gewächshausversuch geleistete Ertragssteigerung auf die Bakterien zurückgeführt werden konnte: Alginat-Kugeln ohne immobilisierte Zellen hatten nach etwa 100 d keinen Einfluss auf das Wachstum von *Lolium perenne* (siehe Abb. 14), direkt an den Samen anhaftende Bakterienzellen hingegen verursachten sogar die höchste Trockenmassezunahme von etwa 60% (siehe Abb. 17 und Abb. 39). Grandlic et al. (2009) stellten bei Applikation von sterilen Alginat-Kugeln bei *Atriplex lentiformis* sogar einen negativen Effekt auf die Biomasse fest, der eventuell aber auch durch den gefriergetrockneten Zustand jener Kugeln verursacht wurde oder vielleicht von der Pflanzenart abhängig ist.

Es konnte zudem in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen werden, dass eine nachträgliche Applikation des Isolats in Form von Alginat-Kugeln keine Auswirkungen mehr auf das weitere ober- und unterirdische Wachstum von *Lolium perenne* hat (Abb. 18 und Abb. 19). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die von Isolat 2.2 ausgehende Wachstums-

förderung nur in frühen Stadien der Pflanzenentwicklung vermittelt wird. Bashan (1986b) wies für drei PGPR-Stämme nach, dass eine Inokulation etwa drei Wochen nach der Keimung keinen Effekt mehr auf Weizenpflanzen (*Triticum aestivum*) hatte. Auch beim Test mehrerer aufeinanderfolgender Beimpfungen waren in jener Studie erst ab der vierten wiederholten Inokulation geringe Förderungen des Wachstums zu sehen, allerdings wurde dort im Abstand von je acht Tagen inokuliert. Der hier im Versuch beobachtete ausbleibende Effekt einer Nachbeimpfung könnte aber auch mit der applizierten Zellzahl verbunden sein (vgl. Abschnitt 4.2.5).

In Hinblick auf die Nutzung von Alginat zur Immobilisierung der Bakterienzellen lieferten die hier durchgeführten Experimente scheinbar unschlüssige Ergebnisse. Unter den gleichen Inokulationsbedingungen wie schon im ersten Experiment (mit 12 g Kugeln pro Topf bei gleicher Zellzahl von etwa $2 \cdot 10^9$ CFU g⁻¹) zeigte Isolat 2.2 im zweiten und dritten Gewächshausversuch keine signifikante Förderung des Pflanzenwachstums mehr, und auch die durchschnittliche Ertragssteigerung betrug mit 9% nur etwa ein Fünftel. Höhere Erträge ließen sich im zweiten Gewächshausversuch jedoch bei Nutzung von insgesamt weniger Zellen erreichen (siehe Abb. 14 und Abb. 15), wobei 6 g der gleichen Kugeln pro Topf fast 50% mehr pflanzliche Biomasse im Vergleich zur Kontrolle lieferten und 12 g Kugeln mit einer um den Faktor 25 verringerten Zellzahl ($8 \cdot 10^7$ CFU g⁻¹) erhöhten die Trockenmasse um über 30%. Entgegen dieser Beobachtung führte die Erhöhung der Alginat-Kugelmenge auf insgesamt 18 g bzw. 24 g pro Topf wiederum zu gesteigerten Erträgen von 25% bzw. über 40%. Gründe hierfür lassen sich nur vermuten, da entscheidende Faktoren wie etwa die Zahl der Zellen, die wirklich auch die Pflanzenwurzeln besiedeln konnten, nicht bestimmt wurden. Die insgesamt verabreichte Zellzahl könnte aber hierbei eine wichtige Rolle spielen (vgl. Kapitel 4.2.5).

Die im dritten Experiment erfolgte Nutzung von Kugeln mit Zellen, die durch zwei Antibiotika-Resistenzen markiert wurden, sorgte für eine um etwa 37% höhere durchschnittliche Biomasse im Vergleich zur Kontrolle bzw. um 28% im Vergleich zu den Zellen ohne Markierung (siehe Abb. 24). Der Grund hierfür könnte in dem durch die Resistenzen vermittelten Vorteil gegenüber der autochthonen Mikroflora vermutet werden, da so eventuell die Antibiotika von um Wurzelexsudate konkurrierenden Streptomyceten, die als typische Bodenbakterien beschrieben sind und u.a. Streptomycin produzieren (Kämpfer 2006), unwirksam gemacht wurden. Das Vorhandensein dieser Mikroorganismen im Abdecksubstrat konnte von Majewski (2005) u.a. durch genus-spezifische PCR-Methoden nachgewiesen werden.

Die Abb. 39 zeigt zusammengefasst die Ertragssteigerungen der mit Isolats 2.2 beimpften REKAL/SAV-Varianten aus allen Gewächshausversuchen, wobei nur mit Mineraldünger behandelte Ansätze und die Werte des ersten Schnitts nach jeweils etwa 100 d berücksichtigt wurden. Die Kontrolle gibt den Mittelwert der insgesamt 20 Ansätze wieder, die hierauf bezogene knapp 30%ige Ertragsteigerung ergibt sich aus den insgesamt 45 Ansätzen, in denen das Isolat eingebettet in Alginat-Kugeln zur Inokulation genutzt wurde (in unterschiedlichen Mengen und mit unterschiedlichen Zellzahlen pro Gramm der Kugeln). Die insgesamt etwa 55%ige Steigerung durch Sameninokulation fasst die zehn Einzelwerte des zweiten und dritten Gewächshausexperiments zusammen. Durch beide Inokulationsmethoden ließen sich signifikante Erhöhungen der oberirdischen Trockenmasse erreichen ($p < 0,001$).

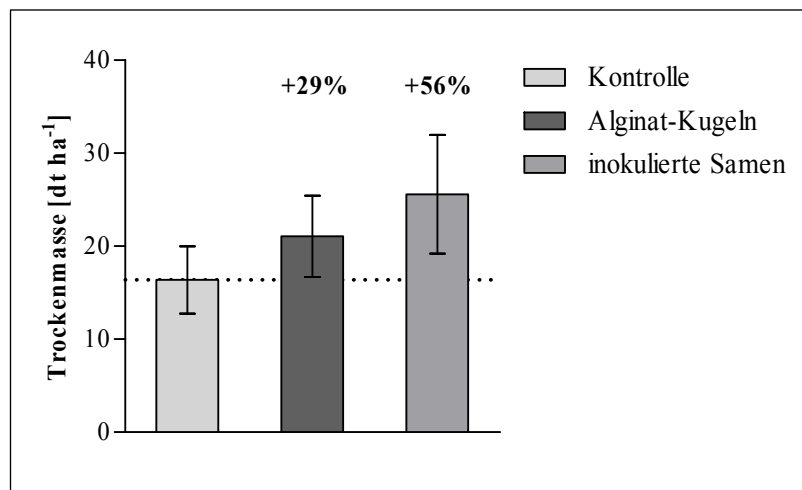


Abb. 39: Durch Isolat 2.2 hervorgerufene Ertragssteigerungen (zusammengefasst)

Dargestellt sind die aus allen Gewächshausversuchen zusammengefassten Daten der oberirdischen Trockenmasse von *Lolium perenne*, das für etwa 100 d auf REKAL/SAV angezogen, gedüngt und teilweise mit Isolat 2.2 (entweder durch Alginat-Kugeln oder per Sameninokulation) beimpft wurde ($n \geq 10$). Ertragssteigerungen beziehen sich auf die unbeimpfte Kontrolle (gestrichelte Linie).

In der Annahme, dass das Abdecksubstrat der Halde nicht immer homogen ist (vgl. Abschnitt 4.2.1) und auch die Beimpfung der Pflanzen sowohl mit Alginat-Kugeln als auch über Sameninokulation nie einheitlich und wirklich exakt reproduzierbar verlaufen wird, scheint das Zusammenfassen der Einzelexperimente als Gesamtübersicht gerechtfertigt.

Hinsichtlich der Nutzung von Alginat-Kugeln konnte gezeigt werden, dass eine nachträgliche Inkubation der Kugeln im Anschluss an die Polymerisation zwar die Zahl der immobilisierten Zellen etwa um den Faktor 25 erhöht, dieser Schritt scheint jedoch nicht zwingend nötig (siehe Abb. 14) und ohne ihn würde somit der Herstellungsprozess verkürzt und zudem preiswerter gemacht werden. Dies hängt aber jeweils vom eingebetteten Mikroorganismus ab, da der PGPR-Stamm *Azospirillum brasilense* Cd beispielsweise kurz nach der Polymerisation

der Kugeln nur etwa 10^2 CFU pro Gramm Kugeln aufweist, was sich jedoch durch Inkubation der Kugeln in frischem Medium für zwei Tage auf ca. 10^{10} CFU g⁻¹ erhöhen lässt (Bashan 1986a).

Die hier getesteten Alginat-Kugeln bieten zwar den Vorteil, dass sie nach der Herstellung monate- bis jahrelang gelagert werden können, anhand der gewonnenen Ergebnisse zeigt die Applikation aber auch hohe Schwankungen, die mit der eher zufälligen Verteilung der Kugeln und auch der Anzahl der immobilisierten Zellen (vgl. Abschnitt 4.2.5) zusammenhängen könnten. Zwar wurde gerade im Gewächshausversuch manuell dafür Sorge getragen, dass Kugeln und Samen bei der Aussaat nicht zu weit von einander platziert wurden, bei einer Applikation in größerem Maßstab wie etwa bei den maschinellen Begrünungsmaßnahmen der Halde Sigmundshall hingegen ließe sich dies nicht realisieren. Eventuell könnte hier durch Nutzung kleinerer Kugeln oder durch Gefriertrocknung (Bashan et al. 2002) eine bessere Verteilung erreicht werden, dies bedarf aber weiterer intensiver Forschungsansätze.

Die insgesamt höchste Ertragssteigerung wurde mittels Sameninokulation erreicht, wobei hier auch die höchste Spanne innerhalb der Varianten zu sehen war: wohingegen einer der fünf Töpfe der Variante 2.J des zweiten Gewächshausversuches eine Trockenmasse von 5,9 g aufwies, zeigte ein anderer mit 11,6 g nahezu die doppelte Biomasse (siehe Tab. 25). Im dritten Gewächshausversuch reichte die Spanne von 6,7 bis 13,4 g bei gleicher Art der Inokulation (Variante 3.C, siehe Tab. 26). Grandlic et al. (2009) konnten keine Unterschiede bei der Nutzung von Samen- oder Alginat-Inokulation feststellen, allerdings lagen abgewandelten Inokulations-Durchführungen (z.B. Gefriertrocknung der Kugeln) und Versuche mit anderen Pflanzen vor.

Angesichts der in der vorliegenden Arbeit in Bezug auf Sameninokulation beobachteten starken Schwankungen in den Ertragssteigerungen ergibt sich die Frage, ob die an den Samen anhaftenden Zellen vielleicht vor der Pflanzenkeimung und möglichen Wurzelbesiedlung in manchen der Töpfe durch biotische oder abiotische Faktoren (Trevors et al. 1994) stark dezimiert wurden. Hier hätten z.B. Fraßfeinde wie Protozoen oder auch eine schlechte Nährstoffversorgung die Zellzahlen soweit reduziert haben können, so dass diese nicht mehr zur Wachstumsförderung ausreichten. Könnte die Lebensdauer der Zellen evtl. über andere Haftmittel als die hier genutzte Methylcellulose verlängert werden, so würde sich die Sameninokulation scheinbar als vielversprechendste Methode zur Beimpfung der Pflanzen mit der insgesamt höchsten Steigerung der ober- und unterirdischen Biomasse darstellen (siehe Abb. 20). Eine Bandbreite anderer Haft- bzw. Trägermittel ist in der Literatur zu finden (vgl. u.a. Bashan 1998 oder Nakkareen et al. 2005) und müsste in Verbindung mit Isolat 2.2,

Samen von *L. perenne* und dem Substrat REKAL/SAV getestet werden. Bei Applikation auf der Halde müsste dann jedoch stets dafür gesorgt werden, dass durch ausreichende Bewässerung die Zeitspanne zwischen Aussaat der inokulierten Samen und Keimung der Pflanzen möglichst kurz gehalten wird, um genügend hohe Zellzahlen zur Besiedlung der Wurzeln zu sichern.

4.2.4 Beurteilung des Isolats 2.2 bei Nutzung anderer Substrate

Eine Düngung des REKAL/SAV mittels Durchmischung mit Kompost anstelle von oberflächlicher Mineraldüngergabe brachte insgesamt etwa eine Vervierfachung der Erträge, eine zusätzliche Applikation von Isolat 2.2 in Alginat-Kugeln sorgte jedoch für eine (wenn auch nicht signifikante) Minderung des Ertrags um 14% im Vergleich zur unbeimpften Kontrolle (siehe Abb. 21). Dieser negative Trend nahm jedoch im weiteren Verlauf des Experiments ab und die Biomassen von Kontrolle und inokuliertem Ansatz glichen sich nach einem Monat an.

Warum es hier insgesamt zu keiner Förderung, sondern sogar eher zur Hemmung des Pflanzenwachstums kam, kann nur vermutet werden. Falls das Isolat 2.2 sich eventuell nicht gegen die Mikroflora des Komposts durchsetzen konnte, erklärt dies dennoch nicht die Ertragsminderung nach etwa 100 d. Welche mikrobiologischen Prozesse und Interaktionen im Einzelnen im Substrat abliefen, wurde im Verlauf der Studie nicht erfasst und bedarf weiterer, intensiverer Forschung. Inbar et al. (2005) konnten beispielsweise mittels der kultur-unabhängigen DGGE-Methode (denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese) nachweisen, welche teilweise gravierenden Einflüsse selbst geringe Kompostzugaben auf die Gemeinschaft von Streptomyceten im Boden bzw. in der Rhizosphäre haben. Eine TRFLP-Analyse (terminaler Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) könnte ebenfalls Hinweise auf Veränderungen in den mikrobiellen Populationen geben (Dratwinski 2010).

Zwar konnten in anderen Studien PGPR unter Kompostzugabe wachstumsfördernde Effekte zeigen (Bacilio et al. 2003, Grandlic et al. 2008, 2009), hierbei kommt es jedoch sicherlich auf die einzelnen Faktoren wie Anzuchtsubstrat, Pflanze, Mikroorganismen, Wahl der Inokulation sowie die Zusammensetzung des Gemischs Kompost an. In der oben erwähnten Studie von Grandlic et al. (2008) zeigt sich nämlich auch ein Isolat (wahrscheinlich *Microbacterium* sp.), das im Gegensatz zu den anderen untersuchten Stämmen der Studie in reinem Substrat eine Wachstumsförderung verursachte, nach Kompostzugabe jedoch kaum noch.

Die ebenfalls ausbleibende Wachstumsförderung von Isolat 2.2 in normalem Ackerboden könnte durch die applizierte Zellzahl begründet sein (vgl. Abschnitt 4.2.5), sie kann aber auch

darauf schließen lassen, dass der Mechanismus des Stamms zu Pflanzenwachstums-Förderung im REKAL/SAV zumindest teilweise auf der ACC Deaminase-Aktivität begründet ist. Da im Ackerboden (und vielleicht auch im REKAL/SAV mit zugesetztem Kompost) kein bzw. sicherlich weitaus weniger Stress für die Pflanzen entsteht, zeigt sich die Förderung nur im Abdecksubstrat, welches wahrscheinlich durch Schwermetalle, hohen pH-Wert, vereinzelt hohen Salzgehalt etc. (Niessing 2005) die vermehrte Ethylenbildung in den Pflanzen induziert. Zwar zeigten sich auch im Abdecksubstrat in den Gewächshausversuchen zum Teil keine signifikanten Erhöhungen der Trockenmasse, es waren jedoch immer Trends mit einer durchschnittlichen Ertragssteigerung von mindestens 9% zu verzeichnen. Um dieses Phänomen genauer zu untersuchen, wurden Bemühungen angestellt, vom Isolat 2.2 Mutanten ohne ACC Deaminase-Aktivität zu erzeugen (vgl. Abschnitt 4.3.4).

4.2.5 Mögliche Bedeutung der applizierten Zellzahlen

Bashan (1986b) konnte im Experiment mit Weizen (*Triticum aestivum*) zeigen, dass acht verschiedene Rhizobakterien bei Inokulation mit Zellzahlen zwischen 10^5 und 10^6 CFU ml⁻¹ die größte Förderung des Wurzelwachstums verursachten. Geringere Konzentrationen hatten kaum förderliche Auswirkungen, eine Erhöhung der Zelldichte auf bis zu 10^9 CFU ml⁻¹ brachte bei manchen Stämmen wie z.B. *Azospirillum brasilense* Cd jedoch stark wachstumshemmende Effekte mit sich. Der Autor deutet zudem an, dass bei über 70 verschiedenen PGPR-Stämmen diese Zelldichte von 10^5 bis 10^6 CFU ml⁻¹ den größten förderlichen Einfluss auf das Pflanzenwachstum nimmt. Bei Young et al. (2006) bewirkte der Stamm *Bacillus subtilis* CC-pr104 an Kopfsalatkeimlingen (*Lactuca sativa*) bei $2 \cdot 10^7$ CFU ml⁻¹ die höchste Förderung des Wurzelwachstums mit einhergehender, etwa um 10% verringerter Keimungsrate. Zelldichten von $2 \cdot 10^6$ und $1 \cdot 10^7$ CFU ml⁻¹ hingegen förderten das Sprosswachstum am stärksten und erhöhten die Keimungsrate um je 4%.

Ein im Rahmen der vorliegenden Studie ähnlich durchgeführter Test deutet an, dass von Isolat 2.2 *in vitro* bei einer Zelldichte um ca. 10^7 CFU ml⁻¹ herum an Keimlingen von *Lolium perenne* die höchste Förderung des Längenwachstums eingeleitet wird (siehe Abb. 31). Die hier im zweiten Gewächshausversuch genutzten Inokulationsansätze mit den ungefähr pro Topf applizierten Zellzahlen sind in Tab. 21 zusammengestellt. Wie auch in Abb. 40 grafisch verdeutlicht zu sehen ist, scheint bei applizierten Zellzahlen um etwa $4 \cdot 10^6$ CFU pro Samenkorn die stärkste Wachstumsförderung von Isolat 2.2 auszugehen, welche jedoch bei Verzehnfachung der Zellzahl drastisch reduziert wird, um dann mit weiter ansteigender Zahl wieder zuzunehmen.

Tab. 21: Genutzte Inokulationsmethoden und dabei applizierte Zellzahlen

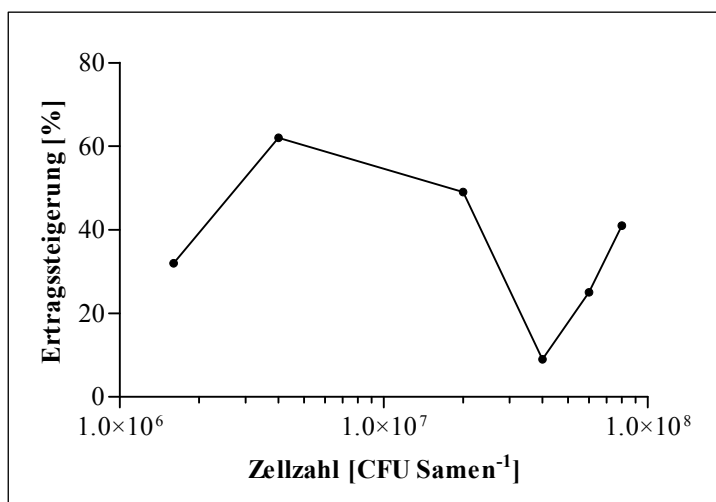
a) Kugeln = Alginat-Kugeln; Samen = Samen mit in Methylcellulose anhaftenden Zellen

b) Bei *Lolium perenne* entspricht 1 g Samen ca. 500 einzelnen Samenkörnern

c) bezogen auf die unbeimpfte Kontrolle

Variante	Inokulations- medium ^a	CFU pro g Medium	Menge pro Topf	CFU pro Topf	CFU pro Samenkorn ^b	Ertrags- steigerung ^c
2.I	Kugeln	$8,0 \cdot 10^7$	12 g	$9,6 \cdot 10^8$	$1,6 \cdot 10^6$	32%
2.E	Kugeln	$2,0 \cdot 10^9$	6 g	$1,2 \cdot 10^{10}$	$2,0 \cdot 10^7$	49%
2.B	Kugeln	$2,0 \cdot 10^9$	12 g	$2,4 \cdot 10^{10}$	$4,0 \cdot 10^7$	9%
2.F	Kugeln	$2,0 \cdot 10^9$	18 g	$3,6 \cdot 10^{10}$	$6,0 \cdot 10^7$	25%
2.G	Kugeln	$2,0 \cdot 10^9$	24 g	$4,8 \cdot 10^{10}$	$8,0 \cdot 10^7$	41%
2.J	Samen	$2,0 \cdot 10^9$	1,2 g	$2,4 \cdot 10^9$	$4,0 \cdot 10^6$	62%

Schenkt man dieser stark idealisierten Darstellung Glauben, könnten verschiedene Erklärungen für dieses Phänomen gefunden werden. Da z.B. die wachstumsfördernde Funktion der Auxine konzentrationsabhängig ist (vgl. Abschnitt 1.2.4.1), könnte eventuell mit zunehmender Zellzahl und einhergehender Auxin-Konzentration auch der wachstumshemmende Effekt des Phytohormons durch induzierte Ethylensynthese zunehmen und den Ertrag durch Hemmung des Wurzelwachstums verringern (Glick et al. 1999). Warum jedoch ab einer gewissen Anzahl von Bakterien pro Samen dann wieder die Biomasse zunimmt, kann in diesem Fall vielleicht durch die ACC Deaminase-Aktivität der Zellen erklärt werden, die vielleicht vorher noch nicht ausreichend stark war, um die pflanzliche Ethylensynthese zu unterbinden. Vielleicht wird aber auch bei diesen höheren Zelldichten ein noch unbekannter Wirkmechanismus aktiviert, der über das zelldichte-abhängige System Quorum Sensing

**Abb. 40: Möglicher Zusammenhang zwischen Zellzahl und Ertragssteigerung *in vivo***

Dargestellt ist die im Gewächshausversuch mit *Lolium perenne* durch Inokulation mit Isolat 2.2 erreichte Ertragssteigerung bezogen auf die eingesetzte Zellzahl (umgerechnet auf CFU pro Samenkorn).

gesteuert wird (Bassler 1999). Selbstverständlich handelt es sich hierbei um rein hypothetische Überlegungen, da die vorliegenden Zahlen stark idealisiert sind. Ob z.B. alle über Alginat-Kugeln verabreichten Zellen auch wirklich die Pflanzen erreicht und ausreichend besiedelt haben, wurde in der vorliegenden Untersuchung nicht nachverfolgt. Und auch die Zahl der an den Samen anhaftenden Zellen kann zwischen Aussaat und Keimung der Pflanzen durch verschiedene Faktoren (s.o.) reduziert worden sein.

Die Umrechnung von den hier dargestellten Zellen pro Topf bzw. pro Samenkorn auf eine Dimension, die der Konzentration an Zellen pro Lösungsvolumen (also CFU ml⁻¹) entspricht, stellt sich ebenfalls als nahezu unmöglich dar, da allein beim Gießen schon unterschiedlich stark bewässert wird und somit auch die Bakterien in unterschiedlichen Konzentrationen vorliegen. Darüber hinaus sind diese Zellsuspensionen im Substrat durch Trocknungsvorgänge schnell wieder höher konzentriert, was insgesamt eine Übertragung der hier (vgl. Abschnitt 3.8) und von u.a. Bashan (1986b) *in vitro* gemessenen "idealen" Zellzahlen schwierig macht.

Dennoch könnte die Zahl der verabreichten Bakterienzellen von großer Bedeutung sein und eine Formulierungsmethode nötig machen, die eine konstante Zellzahl ermöglicht und somit den Erfolg der Inokulation nicht von "zufälliger" Verteilung der Bakterien abhängig macht. Dies würde wieder für eine Applikation der Zellen per Sameninokulation in geeignetem Haftmittel sprechen.

4.3 Identifizierung und Beurteilung des Isolats 2.2

Wie bereits dargestellt konnte vom Isolat 2.2 eine zum Teil hochsignifikante Förderung des Wachstums von *Lolium perenne* bewirkt werden. Die einleitenden Charakterisierungsmaßnahmen ordnen das Isolat den fluoreszierenden Pseudomonaden zu, was durch weiterführende Ansätze verifiziert werden sollte.

4.3.1 Identifizierung durch Sequenzierungsmaßnahmen

Durch direkte Sequenzierung der nach Edwards et al. (1989) mit dem Primerpaar pA/pH (siehe Abb. 6) erstellten PCR-Produkte ließen sich 1438 bp der 16S rDNA ermitteln. Diese Sequenz konnte jedoch durch Kombination mit den Sequenzierungs-Teilergebnissen der Amplikons der Primer fPS16S/rPs23S (siehe unten) auf eine gesicherte Gesamtsequenz von 1477 bp verlängert werden. Diese Basenabfolge zeigte die höchste Übereinstimmung mit der von *Pseudomonas fluorescens* Pf29A, einem als guten Besiedler von Weizenwurzeln beschriebenen Antagonisten gegen den Pilz *Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, den Verursacher der Getreidekrankheit "Schwarzbeinigkeit" oder "take-all decline" (Chapon et al. 2002). Der ebenfalls von der Sequenz her sehr ähnliche Stamm *Pseudomonas* sp. K94.37 ist ein DAPG-produzierender Antagonist gegen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici*, der ein Pathogen der Tomate darstellt (Wang et al. 2001). Die hohe Sequenzübereinstimmung mit dem Stamm *Pseudomonas fluorescens* Ps 2-3, einem nicht weiter beschriebenen Isolat aus Indien, wird zusätzlich durch die hohe Übereinstimmung der ACC Deaminase-Gene der beiden Stämme gestützt (vgl. Abschnitt 3.10). Letztendlich stand aufgrund der durchgeführten Direkt-Sequenzierungen nicht die gesamte 16S rDNA-Basenabfolge des Stamms 2.2 von etwa 1550 bp zur Verfügung, die die Abgleiche noch weiter absichern könnte. Bedacht werden muss bei diesen Sequenzvergleichen aber auch, dass die Stämme mit höchsten Übereinstimmungen (wie vielleicht hier auch) durchaus keine valide beschriebenen Stämme sondern lediglich Isolate sein können, deren Identifizierung von den jeweiligen Arbeitsgruppen nur provisorisch durchgeführt wurde und somit eventuell eine falsche Spezieszuordnung und -angabe in der Datenbank erfolgt ist.

Die phylogenetische Analyse anhand verschiedener Rechenmethoden ordnet das Isolat am ehesten der von Anzai et al. (2000) festgelegten "*Pseudomonas fluorescens*"-Gruppe zu, in der sich neben der namensgebenden Spezies auch andere wie etwa *P. corrugata*, *P. migulae*, *P. tolasii* und *P. veronii* finden. Der in beiden Dendrogrammen am nächsten gelegene Typ-Stamm ist *P. brassicacearum* DSM 13227^T, ein Sequenzvergleich ließ sich jedoch aufgrund der Unvollständigkeit der Sequenzen beider Stämme nur über einen Bereich von 1428 nt

bewerkstelligen, wobei sich eine Übereinstimmung von 99,2% zeigte. In der vorliegenden Analyse wurden aber auch nicht alle der 188 momentan (Stand: Mai 2010) nach Euzéby (1997) valide beschriebenen Spezies des Genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) mit einbezogen, was das Isolat unter Umständen aufgrund höherer Sequenz-Homologien einer anderen Spezies zuordnen könnte.

Die oben bereits erwähnte PCR zur Amplifikation der zwischen 16S und 23S rDNA liegenden ITS1-Region (*internal transcribed spacer*) sollte eine genauere Zuordnung des Isolats ermöglichen, da dieser Region mehr Variabilität als der 16S rDNA zugesprochen wird und durch sie beim Genus *Pseudomonas* zwischen nahen Verwandten differenziert werden kann (Locatelli et al. 2002). Die PCR lieferte zwar ein deutliches Amplikon von ca. 1300 bp, die Direkt-Sequenzierung vom Primer fPs16S aus brachte allerdings nur eine auswertbare Basenabfolge hervor, die in etwa der Hälfte des 16S rDNA-Gens entsprach (siehe Abb. 6). Darüber hinaus und auch vom Primer rPs23S aus ließ sich keine auswertbare Sequenz ermitteln. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Sequenzierung des pA/pH-Amplikons, das an zwei Positionen der 16S rDNA überlagerte Basen aufwies und insgesamt für das bei zahlreichen Bakterienspezies beschriebene Vorhandensein mehrerer *rrn*-Operons spricht (Farrelly et al. 1995).

Durch die Sequenzierung ribosomaler Gene konnte keine eindeutige Spezies-Zuordnung erfolgen, hierzu bietet sich unter Umständen die zusätzliche Untersuchung weiterer Gene wie etwa das der Untereinheit B der Gyrase (*gyrB*) und des Transkriptionsfaktors σ^{70} (*rpoD*) an (Yamamoto et al. 2000).

4.3.2 Identifizierung anhand weiterer Differenzierungsmaßnahmen

Die GN-Karte des VITEK[®] Systems mit ihren 47 Einzelreaktionen soll 135 Taxa der wichtigsten fermentativen und nicht fermentativen Gram-negativen Stäbchen erfassen können, wobei diese Wichtigkeit hauptsächlich einer klinischen bzw. human-pathogenen Bedeutung entspricht. Die neun Spezies der Gattung *Pseudomonas*, zwischen denen das System differenzieren können soll, sind *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. luteola*, *P. mendocina*, *P. oryzihabitans*, *P. pseudoalcaligenes*, *P. putida* und *P. stutzeri* (Pincus 2006). Das Ergebnis der automatischen Differenzierung von Isolat 2.2 schwankt zu etwa gleichen Teilen zwischen *Acinetobacter baumannii* complex, *Pseudomonas fluorescens* und *Acinetobacter haemolyticus*, wobei die Zugehörigkeit des Isolats zur Gattung *Acinetobacter* allerdings ausgeschlossen werden kann, da diese Bakterien unbeweglich und oxidase-negativ sind (Towner 2006). Die Auswertungssoftware rät zu den Zusatz-

untersuchungen Oxidase-Test und dem Nachweis des Enzyms Arginindihydrolyase, um eine Zugehörigkeit zur Spezies *Pseudomonas fluorescens* zu verifizieren. Beide Tests wurden im Rahmen der Untersuchung mittels API 20 NE durchgeführt und als positiv bewertet (wenn auch die Arginindihydrolyase-Reaktion verlangsamt ist). Es ist aber auch anzumerken, dass *P. fluorescens*, *P. putida* und *P. stutzeri* unter Umständen in der GN-Karte nicht reagieren und somit eine Identifizierung erschwert werden kann (Pincus 2006). Beispielsweise war die Assimilations-Reaktion von D-Mannitol im VITEK[®] System negativ, im API 20 NE und im API 50 CH war sie jedoch bereits nach 24 h als eindeutig positiv zu bewerten. Das System ist somit ungeeignet zur genaueren Speziesbestimmung bei Pseudomonaden, die Einzelergebnisse (Tab. 27) geben jedoch zumindest Hinweise über die Stoffwechseleigenschaften des Isolats.

Die Antibiogramme des Isolats (siehe Tab. 28 und Tab. 29) zeigen die beim Genus *Pseudomonas* typischen intrinsischen Resistenzen gegenüber Nitrofurantoin und den β -Lactam-Antibiotika wie Penicillinen (hier Ampicillin allein oder in Kombination mit dem β -Lactamase-Inhibitor Sulbactam) und Cephalosporinen der zweiten (Cefuroxime) und teilweise dritten Generation (Cefotaxime, Cefpodoxime) (Yao & Moellering 1999).

Die nachgewiesenen Fettsäuren sind die für den Genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) typischen Verbindungen wie 10:0 3OH, 12:0, 12:0 3OH, 16:0 und 18:1 w7c (Vancanneyt et al. 1996) und weisen das Isolat 2.2 mit hoher Sicherheit dieser Gattung zu, eine Speziesermittlung ist aufgrund der Daten jedoch nicht möglich. Die höchste Übereinstimmung von etwa 68% hat das Fettsäuremuster mit der Spezies *Paucimonas lemoignei*. Diese gehörte vorher zur Gattung *Pseudomonas*, wurde aber von Jendrossek (2001) als neuer Genus beschrieben. Die Zugehörigkeit des Isolats 2.2 hierzu kann aber ausgeschlossen werden, da *Paucimonas lemoignei* ATCC 17989^T, der Typstamm der Gattung, nur zehn bekannte Kohlenstoffquellen wie u.a. Polyhydroxybutyrat zum Wachstum nutzen kann. Eine Assimilation von Glucose oder gar das Wachstum in einem Komplexmedium wie z.B. LB-Medium ist für *Paucimonas lemoignei* nicht möglich und unterscheidet ihn somit eindeutig von Isolat 2.2, das verschiedenste Kohlenstoffquellen nutzen kann (siehe Tab. 14 und Tab. 23). Die vom Isolat ermittelte Teilsequenz der 16S rDNA zeigt zudem nur ca. 82% Übereinstimmung mit der Sequenz des Typstamms (AB021375).

Die Zugehörigkeit des Isolats 2.2 zu den verschiedenen nach der Fettsäureanalyse vorgeschlagenen Subspezies bzw. Pathovaren der Pflanzenpathogene *Pseudomonas syringae* bzw. *Pseudomonas savastanoi* ist auch anzuzweifeln, da diese Spezies im Gegensatz zum Isolat im Oxidase-Test ein negatives Ergebnis zeigen (Sands et al. 1967). Auch die Analyse

der 16S rDNA zeigt mit nur etwa 98% Übereinstimmungen in der Basenabfolge keine nahe Verwandtschaft zu diesen Spezies (siehe auch Abb. 26 und Abb. 27), und darüber hinaus hat sich das Isolat 2.2 *in vitro* und *in vivo* als pflanzenwachstums-fördernd herausgestellt. Allerdings ist anzumerken, dass z.B. der Stamm *Pseudomonas brassicacearum* Am3 das Wachstum von Erbsen (*Pisum sativum*), Raps (*Brassica napus*) und Indischem Senf (*B. juncea*) fördert, je nach Inokulumsdichte kann er aber sowohl förderlich (bei 10^6 CFU ml⁻¹) als auch hemmend (10^8 CFU ml⁻¹) das Wurzelwachstum von Tomaten (*Solanum lycopersicum*) beeinflussen (vgl. auch Abschnitt 4.2.5). Bei der Infektion von Wunden kann der Stamm sogar pathogen auf diese Nutzpflanze einwirken (Belimov et al. 2007). Der positive Effekt auf das Wurzelwachstum wird in jener Studie der ACC Deaminase-Aktivität zugesprochen, bei höheren Populationsdichten kommt es jedoch wohl zur Produktion von wachstums-hemmenden Phytotoxinen. Die Autoren argumentieren zudem, dass anhand dieser Ergebnisse die Inokulation mit vermeintlichen PGPR genau auf die jeweiligen Pflanzen und Anzuchtbedingungen abgestimmt sein muss und mögliche hemmende oder gar pathogene Effekte auf benachbarte oder folgende Pflanzen ausgeschlossen werden müssen. Erste Untersuchungen des Isolats 2.2 hierzu zeigen aber, dass der Stamm *in vitro* mit zunehmender Zelldichte von 10^6 CFU ml⁻¹ bis 10^8 CFU ml⁻¹ auch zunehmend förderlichen Einfluss auf das Wurzelwachstum vom Weidelgras nimmt (siehe Abb. 31). Hierzu bedarf es jedoch weiterer Studien, auch mit anderen Pflanzen.

4.3.3 Beurteilung der Wurzelbesiedlung

Im Gewächshausversuch wurde mittels Antibiotikaresistenz-Markierung belegt, dass das Isolat 2.2 auch nach etwa drei Monaten noch auf den Wurzeln von *Lolium perenne* nachgewiesen werden kann. Die Tatsache, dass diese markierten Zellen nur in einem der fünf beprobten Töpfe zu finden waren, könnte methodisch bedingt in der nur zufälligen Entnahme der Wurzeln begründet sein. Günstiger wäre hier gewesen, die Wurzeln der Länge nach in mehrere Segmente (von der Basis bis zur Spitze) aufzuteilen und diese separat zu untersuchen, um so die Besiedlung besser beurteilen zu können (Normander et al. 1999, Lugtenberg et al. 2001). Die Reversion der Mutanten zum Wildtyp, verursacht durch den Verlust der spontan-induzierten Resistenz gegen eines der in der selektiven Anzucht verwendeten Antibiotika, könnte ein weiterer Grund dafür sein, dass die Zellen in manchen der Töpfe nicht wieder nachgewiesen werden konnten. Berg et al. (2001) waren jedoch dazu in der Lage, verschiedene durch spontane Rifampicin-Resistenz markierte Stämme (u.a. auch Pseudomonaden) nach zehn Wochen im Gewächshaus auf den Wurzeln von Erdbeeren

(*Fragaria x ananassa*) nachzuweisen, wobei etwa zwischen $5 \cdot 10^4$ und $5 \cdot 10^5$ CFU pro Gramm Wurzeln vorlagen.

Die genaue Verteilung der Zellen von Isolat 2.2 auf den Wurzeln von *L. perenne* wurde zwar nicht im Rahmen der dargestellten Gewächshausversuche analysiert, erste Untersuchungen hierzu erfolgten jedoch unter gnotobiotischen Bedingungen mittels mikroskopischer Studien. Nach der für die Fluoreszenz-Mikroskopie notwendigen Übertragung des GFP-Plasmids pSM1890 auf das Isolat zeigte sich dieses im Vergleich zum Wildtyp ohne Plasmid in der Wachstumsgeschwindigkeit beeinträchtigt, was auf eine metabolische Belastung aufgrund der Expression des grün fluoreszierenden Proteins hindeuten könnte (Füchslin et al. 2003). Der unmarkierte Wildtyp wird also eventuell *in vivo* die Wurzeln stärker oder dichter besiedeln, dieser direkte Vergleich wurde jedoch im Rahmen der Studie nicht gemacht. Die aus den ausplattierten Wurzelsuspensionen ermittelten, nahezu gleichen Zahlen von angewachsenen Zellen auf Medium sowohl mit als auch ohne Antibiotika deuten auf eine hohe Stabilität des Plasmids pSM1890 im Isolat 2.2 hin. Bei Verlust des Plasmids während der mehrwöchigen Inkubationszeit in der Gewächskammer wären auf dem Medium ohne die Antibiotika Streptomycin und Gentamycin entsprechend mehr Zellen angewachsen als unter Selektionsdruck, da das Plasmid die Resistenzen gegenüber diesen Agenzien vermittelt.

Die fluoreszenz-mikroskopisch ermittelte Verteilung der Bakterienzellen entlang der Wurzel entsprach dem in der Literatur oftmals beschriebenen Bild, wobei sich die Zellen generell in Mikrokolonien anordnen und diese besonders an Stellen zwischen einzelnen Rhizodermiszellen zu finden sind (Chin-A-Woeng et al. 1997, Hansen et al. 1997, Gamalero et al. 2004). An diesen Zwischenräumen sollen vermehrt Wurzelexsudate ausgeschieden werden, die von den Rhizobakterien als Nährstoffquelle genutzt werden (Bowen & Rovira 1976). Eine vermutlich in solch einer Vertiefung liegende, stark verlängerte Kolonie entlang der Hauptwurzel (vgl. Abb. 33 A) konnte ähnlich auch beim GFP-markierten BCA-Stamm *Pseudomonas putida* PRD16 von Götz et al. (2006) beschrieben werden, wobei dort besiedelte Tomatenwurzeln betrachtet wurden.

Unabhängig vom Grad der Bewässerung lagen hier in der Studie verschiedene Kolonisierungsmuster vor: manchmal war die Besiedlung von der Wurzelbasis her abnehmend, teilweise lag aber auch eine durchgängige, oftmals intensive Verteilung der Zellen bis hin zu den vereinzelt stark besiedelten Wurzelspitzen vor. Stämme, die sich bis zur Spitze hin ausbreiten, werden als "gute" oder "effektive" Besiedler bezeichnet (Lugtenberg & Dekkers 1999). Nach Lugtenberg et al. (2001) besiedeln Pseudomonaden die Wurzelspitzen von Gräsern allerdings auch besser als z.B. die von Tomaten, da die Bakterien die Wurzelexsudate

von Monokotylen besser verwerten können sollen als die von Dikotylen. Die hier beobachtete unterschiedlich starke Kolonisierung auf den Wurzeln auch innerhalb eines Topfes könnte an der Nutzung der Alginat-Kugeln liegen, da vielleicht beim Gießen der Pflanzgefäße Kugeln und Samen durch Wegspülen voneinander getrennt wurden. Dies könnte auch unter Umständen ein Grund für die Ertrags-Schwankungen innerhalb der Gewächshausversuche sein, allerdings zeigten sich diese Fluktuationen auch bei den unbeimpften Kontrollansätzen und besonders auch bei den Varianten mit Sameninokulation. Eine fluoreszenz-mikroskopische Untersuchung von Pflanzen, die per Sameninokulation beimpft wurden, könnte hierüber Auskunft geben.

Insgesamt muss hinsichtlich der hier beobachteten Fähigkeit des Isolats 2.2 zur Wurzelbesiedlung auch gerade angesichts der ermittelten hohen Zellzahlen von etwa $5 \cdot 10^7$ CFU pro Gramm Wurzelfrischmasse angemerkt werden, dass in der hier dargestellten Studie autoklaviertes Substrat zur Anzucht der Pflanzen genutzt wurde. In einem solchen gnotobiotischen System verläuft die Ausbreitung auf den Wurzeln anders als in einem "natürlichen" Boden mit konkurrierender autochthoner Mikroflora und auch Fraßfeinden z.B. in Form von Protozoen (Jousset et al. 2008). Die hohen durch Ausplattieren und Koloniezählen ermittelten Zellzahlen deuten aber auch darauf hin, dass das Isolat 2.2 nach der Inokulation nicht oder zumindest nur zu einem geringen Teil in das VBNC-Stadium (*viable but not culturable*) übergeht. Dieses wird beschrieben als ein Zustand, in den besonders Gram-negative Bakterien unter Stress verfallen und dann zwar weiterhin stoffwechselaktiv bleiben, im Labor aber nicht mehr kultiviert und somit auch nicht mehr mit kultur-abhängigen Methoden detektiert werden können (Oliver 2005). Gauthier (2000) gibt eine Übersicht über die Faktoren, die das VBNC-Stadium einleiten können, worunter u.a. neben Trockenheit und Nährstoffmangel auch hohe Salz- und Kupfergehalte fallen. Normander et al. (1999) beschreiben, dass die Zellen des Stamms *Pseudomonas fluorescens* DR54-BN14 direkt nach der Inokulation von Gerste (*Hordeum vulgare*) zu 75% in diesem Stadium vorliegen, sich der Anteil im Laufe der Zeit aber auf etwa 25% einpendelt. Das Ergebnis des dritten Gewächshausversuch liefert hierfür vielleicht einen Hinweis, jedoch bedarf es weiterer Untersuchungen, um die Fähigkeit des Isolats 2.2 zur *in vivo* Wurzelbesiedlung und die damit verbundenen Einflüsse auf den Stamm beurteilen zu können.

Die zusätzlich durchgeführte Darstellung der Wurzelbesiedlung durch Rasterelektronen-Mikroskopie war sowohl durch die den Wurzeln anhaftende Schleimschicht als auch durch die zahllosen damit assoziierten Partikel erschwert, die wohl hauptsächlich vom Substrat herrühren, vielleicht aber auch teilweise Sporen von Pilzen darstellen könnten. Trotz des

heterogenen Bilds konnten an verschiedenen Regionen der Wurzeln Bakterienzellen gefunden werden, die zum Teil auf der Wurzel bzw. Schleimschicht auflagern, teilweise aber auch unter dieser verborgen waren und nur an Bruchstellen der Schicht detektiert werden konnten. Hierbei zeigten sich neben verstreuten Einzelzellen auch Mikrokolonien aus mehreren dicht gelagerten Zellen. Die genaue Lage, also z.B. die Abgrenzungen einzelner Epidermiszellen, ließen sich nicht ausmachen.

Insgesamt konnte nachgewiesen werden, dass das Isolat nach Inokulation dazu in der Lage ist, die Wurzeln von *Lolium perenne* zu besiedeln und auch über längere Zeit eine Population zu etablieren.

4.3.4 Untersuchungen des Wirkmechanismus der Pflanzenwachstums-Förderung

Antagonistische Eigenschaften des Isolats wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, da auf der Rückstandshalde Sigmundshall bisher keine Probleme mit z.B. pathogenen Pilzen auftreten und Störungen im Pflanzenwachstum hauptsächlich durch die schlechte Verfügbarkeit von Nährstoffen und wahrscheinlich vom Substrat ausgehende Stressfaktoren gegeben sind. Eine verbesserte P-Versorgung der inokulierten Pflanzen konnte bereits dargestellt werden (siehe Abschnitt 4.2.2), aber auch gerade angesichts der Ergebnisse der Gewächshausversuche mit Ackerboden (vgl. Abschnitt 4.2.4) lässt sich vermuten, dass zumindest einer der Wege zur Förderung von Pflanzenwachstum auf Abdecksubstrat die Senkung des Stressethylens in den Pflanzen mittels des Enzyms ACC Deaminase ist.

ACC Deaminase konnte bei einer Vielzahl von Bodenbakterien (Blaha et al. 2006), in Pilzen wie dem pflanzenwachstums-fördernden *Trichoderma asperellum* T203 (Viterbo et al. 2010), und auch in Pflanzen wie z.B. der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) nachgewiesen werden (McDonnell et al. 2009). Hontzeas et al. (2005) und Blaha et al. (2006) nehmen an, dass sich das zugehörige Gen (*acdS*) teilweise auch über horizontalen Gentransfer ausgebreitet hat. Für Mikroorganismen in der Rhizosphäre liegt der evolutionäre Vorteil des Enzyms zum einen in der Bereitstellung der Nährstoffe, die für Konkurrenten ohne Fähigkeit zur Spaltung des ACC nicht verfügbar sind. Zum anderen werden durch Förderung des Pflanzenwachstums die Erhaltung des Lebensraums Rhizosphäre und die Versorgung mit Wurzelexsudaten gesichert.

Ein Hinweis auf die von Hontzeas et al. (2005) beschriebene Heterogenität der ACC Deaminase-Gene verschiedener Organismen ist die Tatsache, dass zu Anfang der vorliegenden Untersuchung diverse PCR-Protokolle zur Amplifikation von *acdS* (u.a. Caballero-Mellado et al. 2007, Saravanakumar & Samiyappan 2007) getestet wurden, jedoch

trotz verschiedenster Modifikationen keine PCR-Produkte erhalten werden konnten. Die hierbei genutzten Primer konnten wohl trotz teilweise degenerierten Aufbaus nicht am Gen anlagern. Erst die PCR nach Kamala-Kannan et al. (2010) brachte bei Isolat 2.2 ein etwa 1 kb großes Amplikon hervor, das von der Länge her dem PCR-Produkt des von den Autoren untersuchten Stamms *Pseudomonas entomophila* PS-PJH entspricht. Die Expression des Gens konnte bei Isolat 2.2 anhand des Wachstums mit ACC als Stickstoffquelle vermutet und letztendlich auch durch massenspektrometrische Methoden nachgewiesen werden. Die von der hier ermittelten Gensequenz abgeleitete Aminosäure-Sequenz weist zudem die zur Funktion des Enzyms wichtigen Aminosäuren Lys⁵¹, Ser⁷⁸, Cys¹⁶², Tyr²⁹⁴ und Glu²⁹⁵ auf (Karthikeyan et al. 2004). Der Sequenz-Vergleich zeigt die höchste Übereinstimmung mit der Gensequenz des Stamms *P. fluorescens* Ps 2-3, dessen 16S rDNA auch schon sehr hohe Homologie zu der von Isolat 2.2 aufwies (vgl. Abschnitt 4.3.1). Zu anderen bekannten Sequenzen lagen weitaus geringere Homologien (< 90%) vor, was ebenfalls die allgemeine Heterogenität der ACC Deaminase-Gene verdeutlicht.

Um die Bedeutung des Enzyms in der Pflanzenwachstums-Förderung analysieren zu können, wurden zunächst Transposon-Mutagenesen durchgeführt, die dem *knock-out* des Gens dienen sollten. Die Sequenzierung der Transposon-Insertionsregionen zeigte bei keiner der vier ausgewählten Mutanten auswertbare Sequenzdaten, was dadurch begründet sein könnte, dass das Transposon EZ-Tn5 mehrfach in das Genom der Mutanten inserierte. Ausgehend von diesen mehrfach an verschiedenen Stellen der Gesamt-DNA vorhandenen Transposons als Primer-Bindestellen wurden somit in jeder Probe verschiedene Sequenzen ermittelt, die durch Überlagerung der Basenabfolgen ein nicht auswertbares Gesamtbild ergeben (vgl. auch Sequenzierung der ITS1-Region, Abschnitt 4.3.1).

Es konnte auch phänotypisch nicht genau geklärt werden, ob der *knock-out* des ACC Deaminase-Gens geglückt ist, da die vier Mutanten generell nicht mehr im Minimalmedium M9 wachsen konnten, egal ob mit ACC oder Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle. Somit könnte das genetische Element Tn5 auch (eventuell zusätzlich zum ACC-Abbauweg) einen anderen Teil des Stoffwechsels ausgeschaltet haben, der für das Wachstum in einem Minimalmedium wie M9 notwendig ist. Im nährstoffreichen Standard-I-Nährmedium (einem Vollmedium) wuchsen die Mutanten normal an, und auch im vitaminreichen API AUX-Grundmedium mit zugegebener Glucose zeigten die Stämme Wachstum. Die PCR zur Amplifikation von *acdS* lieferte zudem bei den Mutanten ein gleich langes Amplikon wie beim Wildtyp, was bedeutet, dass das genetische Element nicht innerhalb dieses Gens inserierte, eventuell aber in *upstream* gelegenen Promotorregionen (Glick et al. 2007).

In einem ähnlichen Experiment von Belimov et al. (2007) zeigte eine Transposon-Mutante des Stamms *Pseudomonas brassicacearum* Am3 eine 37fach verringerte ACC Deaminase-Aktivität im Vergleich zum Wildtyp und entsprechend auch ein stark vermindertes Wachstum mit ACC als einziger Stickstoff-Quelle, mit Ammoniumsulfat im Medium war jedoch bei beiden Stämmen die Wachstumskurve identisch. In jenem Experiment schien somit das Transposon wirklich nur einen Schritt des ACC-Abbaus ausgeschaltet zu haben. Eine Sequenzierung der Insertionsstelle wurde aber weder bei jener Mutante des *P. brassicacearum*, noch bei einer anderen Transposon-Mutante der gleichen Arbeitsgruppe (PGPR-Stamm *Variovorax paradoxus* 5C-2) vorgenommen bzw. wurde nichts darüber berichtet (Belimov et al. 2007, 2009).

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Analyse der Mutanten auf veränderte Auxin-Produktion deutete darauf hin, dass durch die Mutagenese die Synthese aus dem zugesetztem Tryptophan behindert zu sein scheint, es sind allerdings auch Trp-unabhängige Auxin-Synthesewege bekannt (Spaepen et al. 2007). Das Ergebnis des Siderophoren-Tests auf CAS-Agar grenzt zumindest die Mutante 2.2.Tn5.A von den anderen ab, da dieser Stamm überhaupt nicht mehr zum Wachstum befähigt war. Aber auch in diesem Medium liegen nur wenige Nährstoffe vor, da das M9-Minimalmedium als Grundlage dient.

Im *in vitro* Versuch hatten die vier Transposon-Mutanten des Isolats 2.2 unterschiedlich starken Einfluss auf das Wachstum der Weidelgras-Keimlinge (siehe Abb. 37). Insgesamt wurden in allen inokulierten Ansätzen die durchschnittlichen Längen der Pflanzenteile erhöht, die statistische Auswertung zeigte aber nur in manchen Fällen eine Signifikanz. Wohingegen Mutante 2.2.Tn5.B beispielsweise weder Spross- noch Wurzelwachstum signifikant zu beeinflussen vermochte, zeigte Mutante 2.2.Tn5.A ein sehr ähnliches Verhalten wie der Wildtyp 2.2 in der Pflanzenwachstums-Förderung.

Da die Insertionsregion des Transposons bei keiner der Mutanten ermittelt werden konnte, fällt eine Diskussion darüber schwer, welche Stoffwechselwege nun genau unterbrochen wurden und somit den positiven Einfluss auf das Wachstum der Keimlinge verhinderten bzw. nicht negativ beeinflussten. Ein zielgerichteter *knock-out* der ACC Deaminase wie etwa bei Li et al. (2000) verspricht hier aussagekräftigere Ergebnisse.

4.3.5 Beurteilung des Isolats 2.2 zur Nutzung in den Rekultivierungsmaßnahmen

Abschließend soll anhand der gewonnenen Ergebnisse die Nutzbarkeit des Isolats 2.2 in den Begrünungsbemühungen der Rückstandshalde Sigmundshall bewertet werden.

Wie bereits erläutert scheint Phosphor der limitierende Faktor für das Wachstum von *Lolium perenne* auf REKAL/SAV zu sein (siehe Abschnitt 4.2.2); ein Umstand, der auch für normale Böden oft beschrieben ist (Hinsinger 2001, Smith 2002). Der Stamm 2.2 wurde deshalb zunächst anhand seiner Fähigkeit zur Lösung von anorganisch gebundenen Phosphaten isoliert, da mit solchen unlöslichen P-Verbindungen wie z.B. Apatiten in der Abdeckschicht der Halde zu rechnen ist (Scheer 2001). Auch das Vermögen zur Solubilisierung unter stark gepufferten Bedingungen wurde *in vitro* nachgewiesen, wobei hier ein alkalischer pH-Wert wie der des Abdecksubstrats gewählt wurde. Somit könnte das Isolat wahrscheinlich auch auf der Halde Phosphat lösen und es den Pflanzen verfügbar machen (Gyaneshwar et al. 1998).

Eine zusätzliche, *in silico* anhand der ermittelten 16S rDNA-Sequenz des Isolats durchgeführte *amplified rDNA restriction analysis* (ARDRA) nach Browne et al. (2009) wies den Stamm zwar einer Gruppe von Pseudomonaden zu, in der nach den Autoren keine "starken" Phosphatsolubilisierer zu finden sind, allerdings wurde in jener Studie nur die Solubilisierung auf Agarplatten und nicht im Flüssigmedium beurteilt, was nicht als alleiniges Kriterium der Bewertung genutzt werden sollte. Anhand unterschiedlicher Diffusionsraten der bakteriellen organischen Säuren im Agar (Johnston 1952) oder auch aufgrund deren Bildung von anderen, zur Trübung beitragenden Komplexen wie z.B. Calciumcitrat (Deubel & Merbach 2005) zeigen sich Phosphatsolubilisierer auf Agarplatten mitunter als "Nicht-Solubilisierer".

Im Gewächshausversuch konnte das ober- und unterirdische Wachstum von *L. perenne* durch Isolat 2.2 teilweise signifikant gefördert werden, und die Aufnahme von P wurde ebenfalls erhöht (wenn auch das Nährelement weiterhin in mangelhaften Konzentrationen in der Biomasse angelegt wurde). Unklar ist noch, ob nun wirklich im Boden gebundenes Phosphat solubilisiert und somit für die Pflanzen zum besseren Wachstum zur Verfügung gestellt wurde, oder ob z.B. über Eingriffe in den Phytohormonhaushalt das Wurzelwachstum gefördert wurde, was letztendlich zur Erschließung von mehr Nährstoffen geführt hat. Ein Zusammenspiel beider Wege ist denkbar, und auch in der Literatur wird eher davon ausgegangen, dass PGPR meist über verschiedene Mechanismen und nicht nur über einen einzelnen das Pflanzenwachstum fördern (Bashan & Levanony 1990, Vessey 2003, Bashan et al. 2004). De Freitas et al. (1997) wiesen z.B. nach der Applikation von Phosphatsolubilisierern bei Raps (*Brassica napus*) Ertragssteigerungen nach, diese gingen aber ebenfalls nicht mit stark erhöhter P-Aufnahme einher, was auch dort auf andere Wirkmechanismen hindeutet. Vyas & Gulati (2009) konnten nachweisen, dass verschiedene phosphat-

solubilisierende Pseudomonaden im Gewächshausversuch bei Mais (*Zea mays*) sowohl die Biomasse als auch die Gehalte von Stickstoff, Phosphor und Kalium erhöhten. Allerdings konnte in jener Studie auch gezeigt werden, dass die Stämme, die *in vitro* am meisten Phosphat solubilisieren konnten, nicht die höchste Wachstumsförderung bei den Pflanzen zeigten. Dies deutet somit auch auf zusätzliche, andere Mechanismen der Förderung hin.

Es konnte belegt werden, dass der Stamm 2.2 dazu in der Lage ist, sich nach der Inokulation auch bei Anwesenheit anderer Mikroorganismen in der Rhizosphäre von *L. perenne* anzusiedeln und dort zu persistieren, was als Grundvoraussetzung für die Nutzbarkeit von PGPR gilt (Bloemberg & Lugtenberg 2001). Zumindest unter gnotobiotischen Verhältnissen konnte auch die Fähigkeit zur Besiedlung der gesamten Wurzel bis zur Spitze hin bestätigt werden. Pseudomonaden werden generell als die effektivsten Wurzelbesiedler bezeichnet (Lugtenberg et al. 2001). Die vom Isolat verwertbaren Kohlenstoffquellen stellen zudem teilweise die von Clayton et al. (2008) in den Wurzelexsudaten von *L. perenne* gefundenen Verbindungen wie z.B. Xylose und Glucose dar. Das Gram-negative Isolat 2.2 könnte hierbei sogar noch einen zusätzlichen Wettbewerbsvorteil haben, da zahlreiche dieser Gram-negativen Bakterien über die periplasmatische Glucosedehydrogenase den von vielen Mikroorganismen leicht verwertbaren Zucker Glucose schnell in die weniger leicht nutzbare Gluconsäure umwandeln können (Whiting et al. 1976), die darüber hinaus auch zur Phosphat-solubilisierung beitragen kann (Rodríguez et al. 2006).

Bei der Besiedlung der Rhizosphäre könnten auch die produzierten Siderophoren dem Isolat Vorteile gegenüber anderen Mikroorganismen verschaffen, denen der oftmals knappe Nährstoff Eisen somit vorenthalten werden könnte (Höfte et al. 1991, Loper & Henkels 1999). Dimkpa et al. (2008) postulieren darüber hinaus, dass Bakterien, die mindestens einen Typ Siderophoren produzieren, besser in Böden leben können, die mit verschiedenen toxischen Metallen belastet sind. Die Autoren konnten zudem für Streptomyceten belegen, dass deren Auxin-Synthese zwar durch Metalle wie etwa Aluminium und Kupfer im Boden vermindert wurde, dieser Hemmung konnte aber durch Siderophoren-Produktion und einhergehende Chelierung der Metalle entgegen gewirkt werden. Da fast alle Pseudomonaden neben dem Pyoverdin oftmals noch andere Siderophoren bilden (Cornelis 2010), könnten somit vielleicht auch die Siderophoren von Isolat 2.2 andere Metalle binden und dadurch deren inhibierenden Einfluss, auch auf das Pflanzenwachstum, vermindern. Hohe Aluminiumkonzentrationen im Boden können z.B. das Tiefenwachstum von Wurzeln hemmen (Gregory 2006), das von *Pseudomonas aeruginosa* gebildete Pyoverdin kann aber stabile Komplexe mit Aluminium bilden, die sogar in die Zellen aufgenommen werden (Greenwald et al. 2008).

Möglicherweise spielen diese bakteriellen Siderophoren aber auch bei der Eisenversorgung der Pflanzen eine Rolle. Laut Scheer (2001) zeigt *L. perenne*, das auf dem Abdeckmaterial angezogen wurde, einen Eisengehalt von 150 ppm in der oberirdischen Biomasse, was manchen Autoren zufolge auf mangelhafte Versorgung mit dem essentiellen Nährelement hindeutet. Zudem ist bei *Lolium perenne* cv. Tove die Abgabe von verschiedenen Phytosiderophoren unter Eisenmangelbedingungen belegt (Ueno et al. 2007), was vielleicht bei zusätzlicher Aufnahme der bakteriellen Komplexbildner den pflanzlichen Bedarf besser decken könnte.

Das vom Isolat verstärkte Wurzelwachstum mag durch diese Siderophoren, gebildete Phytohormone wie z.B. die nachgewiesenen Auxine oder auch die bakterielle ACC Deaminase-Aktivität begründet sein (Glick et al. 1999) und könnte bei Applikation auf der Halde neben besserem Wachstum der Pflanzen auch für eine zusätzliche Verstärkung der aufgetragenen Deckschicht durch stärkere Durchwurzelung sorgen. Durch diese Phytostabilisation würden zudem Verwehungen des teilweise staubigen Abdecksubstrats vermieden werden.

Im Ganzen gesehen könnte das Isolat 2.2 einen wichtigen Beitrag dazu leisten, die pflanzliche Deckschicht der Rückstandshalde Sigmundshall zu verstärken, um letztendlich die jährlichen Menge des anfallenden Haldenwassers zu reduzieren. Darüber hinaus könnte es eventuell auch bei der Begrünung anderer extremer Standorte oder auch im Rahmen von Phytoremediations-Maßnahmen eingesetzt werden (Glick 2003).

5. Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte nach mikrobiologischen Ansätzen gesucht werden, die Begrünungsmaßnahmen der Rückstandshalde Sigmundshall zu unterstützen. Der Fokus wurde dabei auf pflanzenwachstums-fördernde Rhizobakterien (*plant growth-promoting rhizobacteria*, PGPR) gelegt.

Es konnte ein Kollektiv von 34 potentiell wachstums-fördernden Bakterien aus dem Wurzelbereich von auf der Halde wachsendem Deutschen Weidelgras (*Lolium perenne*) isoliert werden. Diese Stämme zeigten *in vitro* die Fähigkeit zur Solubilisierung von unlöslichen Calciumphosphaten in Fest- und Flüssigmedien sowie zur Bildung von Siderophoren. Acht der Isolate wiesen zudem eine ACC Deaminase-Aktivität auf und synthetisierten Auxine aus Tryptophan.

Im Gewächshausversuch förderte eines der Isolate, der Stamm 2.2, wiederholt das Wachstum von *Lolium perenne* auf dem zur Rekultivierung genutzten Abdecksubstrat REKAL/SAV. Alle weiteren Untersuchungen und Tests wurden deshalb auf diesen Bakterienstamm konzentriert. Bei der vom Isolat vermittelten Wachstumsförderung wirkt vermutlich neben der Phosphatsolubilisierung auch die durch die bakterielle ACC Deaminase bedingte Verringerung des pflanzlichen "Stress-Ethylens" positiv auf das Gras ein.

Sowohl bei Nutzung von bakterien-haltigen Alginat-Kugeln als auch per direkter Samen-inokulation ließen sich durch Isolat 2.2 zum Teil signifikante Erhöhungen der ober- und unterirdischen Biomasse der Pflanzen erreichen, wobei Ertragssteigerungen zwischen 9 und 62% erzielt wurden. Die Applikation der Zellen per Sameninokulation schien hierbei die aussichtsreichste Methode zu sein. Es traten bei beiden Formulierungs-Varianten insgesamt hohe Schwankungen in den Erträgen auf, wofür verschiedene Gründe wie z.B. die Zahl und auch der Verbleib der verabreichten Bakterienzellen vermutet werden. Die Rhizosphärenkompetenz des Isolats wurde im Gewächshausversuch jedoch nachgewiesen, und unter gnotobiotischen Bedingungen wurde darüber hinaus auch die Besiedlung der Graswurzeln durch das Isolat mittels Fluoreszenz- und Rasterelektronen-Mikroskopie bestätigt und dokumentiert.

Das wachstums-fördernde Isolat 2.2 gehört dem Genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) und hierbei wahrscheinlich der "*Pseudomonas fluorescens*"-Gruppe an, die Spezies-Zuordnung ist jedoch noch unsicher und bedarf weiterer Untersuchungen. Von den Genen der 16S rRNA sowie auch der ACC Deaminase konnten große Teile sequenziert werden, und das Enzym

ACC Deaminase konnte massenspektrometrisch im Gesamtprotein des Isolats nachgewiesen werden.

Vier durch Transposon-Mutagenese hergestellte Mutanten des Isolats waren im Gegensatz zum Wildtyp-Stamm *in vitro* zum Teil nicht mehr dazu in der Lage, das Wurzelwachstum von *L. perenne* signifikant zu fördern. Diese mutierten Stämme waren teilweise in ihren PGPR-Eigenschaften wie Auxin- und Siderophoren-Produktion eingeschränkt, es konnte aber nicht ermittelt werden, wo genau das genetische Element im Genom inserierte bzw. welche Stoffwechselwege im Einzelnen unterbrochen wurden.

Als Fazit lässt sich aufgrund der bislang vorliegenden Daten sagen, dass das pflanzenwachstums-fördernde Isolat 2.2 die Rekultivierungsmaßnahmen der Rückstandshalde Sigmundshall sinnvoll unterstützen könnte. Die Förderung des Pflanzenwuchses würde zum einen die Verbesserung der Wurzelbildung und damit eine höhere Stabilität der Abdeckung bewirken, wodurch Erosionen und Verwehungen des Substrats verringert werden können. Zum anderen kann die vermehrte pflanzliche Biomasse zu höheren Evapotranspirationsraten führen und somit die Mengen des niederschlagsbedingten Haldenwassers reduzieren.

Darüber hinaus könnte das Isolat vermutlich auch zur Begrünung anderer extremer Standorte eingesetzt werden, an denen Pflanzen aufgrund von Phosphor-Mangel und/oder auch verschiedener Stressfaktoren wie Trockenheit, Salz- und Schwermetallgehalt im Wachstum eingeschränkt sind. Hierzu bedarf es jedoch weiterer Untersuchungen.

6. Ausblick

Die aus der vorliegenden Arbeit gewonnenen Erkenntnisse stellen eine wichtige Grundlage für weiterführende Studien dar. Zukünftige Untersuchungen können in verschiedene Richtungen gehen, zunächst sollte jedoch folgenden Punkten nachgegangen werden:

- **Genauere Identifizierung des Isolats 2.2:** Um eine sichere Spezies-Zuordnung zu ermöglichen, können zunächst weitere relevante Gene (z.B. *gyrB*, *rpoB* oder *rpoD*) durch Sequenzierung analysiert und anhand von Datenbanken mit denen anderer *Pseudomonas*-Stämme verglichen werden. Letztendlich müssen aber Maßnahmen wie u.a. DNA-DNA-Hybridisierungen zur Absicherung erfolgen (Moore et al. 2006).
- **Etablierung einer geeigneten Formulierung:** Hinsichtlich der genauen Beziehungen zwischen applizierter Zellzahl und Ertragssteigerung bedarf es weiterer Untersuchungen, wobei gerade Faktoren wie z.B. die Zahl der eingesetzten Zellen, die sich tatsächlich auch auf der Wurzel ansiedeln, bestimmt werden müssen. Nur so scheint eine Optimierung der Inokulationsmethoden erreichbar. Darüber hinaus sind geeignete Formulierungen bzw. Trägermedien für das Isolat 2.2 zu finden, die eine großflächige Applikation auf der Halde Sigmundshall und damit einhergehende, kontinuierliche Ertragssteigerung ermöglichen.

Neben weiteren Gewächshausversuchen sind gerade auch Feldversuche direkt auf der Halde unerlässlich, um das Isolat und die Formulierung genauer beurteilen zu können.

Über diese Ansätze hinaus bieten sich zahlreiche weitere Untersuchungen an, um die Kenntnisse über die Eigenschaften des Isolats 2.2 sowie seine Nutzbarkeit zu vertiefen. Auch die anderen in der vorliegenden Arbeit isolierten Stämme oder die hier hergestellten Mutanten bieten sich für weiterführende Studien an:

- **Genauere Untersuchung des Mechanismus der Pflanzenwachstums-Förderung:** Die in der vorliegenden Arbeit hergestellten Transposon-Mutanten könnten weiter untersucht werden, zielgerichtete *knock-outs* z.B. der ACC Deaminase oder auch der Auxin-Produktion über Klonierungsarbeiten stellen jedoch einen aussagekräftigeren Weg dar und sollten bevorzugt durchgeführt werden. Durch gas-chromatographische Ethylen-Messungen *in planta* könnte der Nachweis erfolgen, ob die bakterielle ACC Deaminase Auswirkungen auf die Pflanzenentwicklung hat. Versuche mit radio-

aktivem ^{32}P könnten zudem Auskunft darüber geben, welchen Einfluss die Phosphat-solubilisierung auf Wachstum und P-Aufnahme der Pflanzen nimmt.

Weiterhin könnte das Isolat 2.2 auch auf verschiedene antagonistische Fähigkeiten wie z.B. Antibiotika-Produktion hin untersucht werden, um sein Potential als *biocontrol agent* zu beurteilen. Zusätzlich können andere Substrate als das hier untersuchte REKAL/SAV getestet werden, um das Vermögen zur Unterstützung der Begrünung anderer Standorte zu testen.

- **Genauere Untersuchungen zur Rhizosphärenkompetenz:** Die Fähigkeit des Isolats 2.2 zur Wurzelbesiedlung konnte zwar nachgewiesen werden, hierzu bieten sich jedoch noch zahlreiche weiterführende Untersuchungen an, insbesondere auch unter unsterilen und somit "natürlichen" Bedingungen. Parallel dazu sollten auch in regelmäßigen Abständen mikroskopische Untersuchungen der Wurzelkolonisierung erfolgen, um Besiedlung und Verbleib des Stamms nachzuverfolgen. Bei REM-Darstellungen sollte hierbei ein abgewandeltes Proben-Fixierungsprotokoll nach Chin-A-Woeng et al. (1997) gewählt werden, um die auf der Wurzel aufliegende Schleimschicht semi-transparent zu machen. Der durch Fraßfeinde wie u.a. Protozoen verursachte Schwund der Zellen nach der Inokulation könnte zudem in Mikrokosmos-Studien untersucht werden (Jousset et al. 2008).
- **Abwägung des Gefahrenpotentials des Isolats 2.2:** Vor einer großflächigen Applikation sowie der eventuellen Vermarktung des Isolats müssen Tests auf potentielle pathogene Eigenschaften sowohl anderen Pflanzen als auch dem Menschen gegenüber erfolgen. Für letzteres bieten sich z.B. zunächst vorläufige Versuche mit dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* an (Zachow et al. 2009).
- **Weiterführende Untersuchungen der anderen Isolate:** Auch die übrigen im Rahmen der Studie isolierten Rhizobakterien könnten in weiteren Gewächshausversuchen (evtl. in abgewandelten Inokulationsmethoden) auf ihr Potential als PGPR untersucht werden. Besonders interessant wirkt hierfür das Isolat 1.8, das sich vom Isolat 2.2 und seinen vermeintlichen Klonen deutlich unterschieden hat.

7. Abstract

At the potash mining facility Sigmundshall (Germany) a special technogenic soil substitute is being used to cover and recultivate the saline tailings pile, thus reducing the annual amount of brine caused by precipitation. Because of the cover substrate's characteristics like e.g. alkalinity and high contents of calcium and several heavy metals, however, the initial vegetation does not grow optimally and also shows phosphate-deficiency symptoms. Therefore, the aim of the present study was to find suitable *plant growth-promoting rhizobacteria* (PGPR) to support the recultivation process.

The rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) grown on the tailings pile was sampled and a collection of 34 bacterial strains was isolated due to their ability to solubilize calcium phosphate *in vitro*. By screening for ACC deaminase activity, the collective was narrowed down to eight strains, all of which were also able to produce auxins and siderophores. In greenhouse experiments strain 2.2 repeatedly promoted growth of *L. perenne* on the technogenic cover substrate. Significant increase in dry matter was obtained both via application of the bacteria in alginate beads and especially by direct seed inoculation. Colonization of the rhizosphere by the strain was documented in the greenhouse and also in microscopic studies using SEM as well as GFP-labeled cells.

According to different tests including phylogenetic studies the isolate 2.2 belongs to the genus *Pseudomonas* (*sensu stricto*) and therein to the "*Pseudomonas fluorescens*" cluster. Given the present data, however, the exact species could not be determined so far. An attempt to gain insight into the mechanism of growth-promotion was carried out using transposon mutagenesis. Four mutants were no longer able to significantly promote growth of grass seedlings *in vitro*, but the insertion site of the transposon could not be determined thus giving no hint at the disrupted metabolic pathway.

In summary, a plant growth-promoting rhizobacterium was successfully isolated, that could aid in the successive recultivation of the potash tailings pile of the facility Sigmundshall by helping to establish vegetation on the technogenic cover material. Thereby, the annual amount of brine could be further reduced.

Literaturverzeichnis

- Abeles F. B., Morgan P. W., Saltveit Jr. M. E. (1992):** Ethylene in Plant Biology, 2nd Ed. Academic Press, New York, U.S.A.
- Adesemoye A. O., Kloepper J. W. (2009):** Plant-microbes interactions in enhanced fertilizer-use efficiency. *Appl Microbiol Biotechnol* **85** 1-12
- Ahmad F., Ahmad I., Aqil F., Khan M. S., Hayat S. (2008):** Diversity and potential of nonsymbiotic diazotrophic bacteria in promoting plant growth. In: Plant-bacteria interactions. Ahmad I., Pichtel J., Hayat S. (Eds.). WILEY-VCH, Weinheim. 81-109
- Alexander D. B., Zuberer D. A. (1991):** Use of chrome azurol S reagents to evaluate siderophore production by rhizosphere bacteria. *Biol Fertil Soils* **12** 39-45
- Anzai Y., Kim H., Park J.-Y., Wakabayashi H., Oyaizu H. (2000):** Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50** 1563-1589
- Arshad M., Saleem M., Hussain S. (2007):** Perspectives of bacterial ACC deaminase in phytoremediation. *Trends Biotechnol* **25** 356-362
- Bacilio M., Vazquez P., Bashan Y. (2003):** Alleviation of noxious effects of cattle ranch compost on wheat seed germination by inoculation with *Azospirillum* spp. *Biol Fertil Soils* **38** 261-266
- Backman P. A., Wilson M., Murphy. J. F. (1997):** Bacteria for biological control of plant diseases. In: Environmentally safe approaches to plant disease control. Rechcigl N. A., Rechcigl J. E. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. 95-109
- Bais H. P., Weir T. L., Perry L. G., Gilroy S., Vivanco J. M. (2006):** The role of root exudates in rhizosphere interactions with plants and other organisms. *Ann Rev Plant Biol* **57** 233-266
- Barber S. A. (1984):** Soil nutrient bioavailability. John Wiley, New York, U.S.A.
- Bashan Y. (1986a):** Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that effect plant growth. *Appl Environ Microbiol* **51** 1089-1098
- Bashan Y. (1986b):** Significance of timing and level of inoculation with rhizosphere bacteria on wheat plants. *Soil Biol Biochem* **18** 297-301
- Bashan Y. (1998):** Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnol Adv* **16** 729-770
- Bashan Y., de-Bashan L. E. (2005a):** Bacteria, plant growth promoting. In: Encyclopedia of soils in the environment, Vol. 1. Hillel D. (Ed.). Elsevier, Oxford, U.K. 103-115
- Bashan Y., de-Bashan L.-E. (2005b):** Fresh-weight measurements of roots provide inaccurate estimates of the effects of plant growth-promoting bacteria on root growth: a critical examination. *Soil Biol Biochem* **37** 1795-1804

- Bashan Y., Levanony H. (1990):** Current status of *Azospirillum* inoculation technology: *Azospirillum* as a challenge for agriculture. *Can J Microbiol* **36** 591-608
- Bashan Y., Hernandez J.-P., Leyva L. A., Bacilio M. (2002):** Alginate microbeads as inoculant carriers for plant growth-promoting bacteria. *Biol Fertil Soils* **35** 359-368
- Bashan Y., Holguin G., de-Bashan L.-E. (2004):** *Azospirillum*-plant relationships: physiological, molecular, agricultural, and environmental advances (1997-2003). *Can J Microbiol* **50** 521-577
- Bashan Y., Holguin G., Lifshitz R. (1993):** Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. In: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. Glick B. R., Thompson J. E. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. 331-345
- Bashan Y., Puente M. E., de-Bashan L.-E., Hernandez J.-P. (2008):** Environmental uses of plant growth-promoting bacteria. In: *Plant-Microbe Interactions*. Ait Barka E., Clément C. (Eds.). Research Signpost, Trivandrum, Kerala, Indien. 69-93
- Bassler B. L. (1999):** How bacteria talk to each other: regulation of gene expression by quorum sensing. *Curr Opin Microbiol* **2** 582-587
- Belimov A. A., Dodd I. C., Safronova V. I., Hontzeas N., Davies W. J. (2007):** *Pseudomonas brassicacearum* strain Am 3 containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase can show both pathogenic and growth-promoting properties in its interaction with tomato. *J Experimental Botany* **58** 1485-1495
- Belimov A. A., Dodd I. C., Hontzeas N., Theobald J. C., Safronova V. I., Davies W. J. (2009):** Rhizosphere bacteria containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase increase yield of plants grown in drying soil via both local and systemic hormone signalling. *New Phytol* **181** 413-423
- Berg G. (2009):** Plant-microbe interactions promoting plant growth and health: perspectives for controlled use of microorganisms in agriculture. *Appl Microbiol Biotechnol* **84** 11-18
- Berg G., Fritze A., Roskot N., Smalla K. (2001):** Evaluation of potential biocontrol rhizobacteria from different host plants of *Verticillium dahliae* Kleb. *J Appl Microbiol* **91** 963-971
- Berg G., Smalla K. (2009):** Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol* **68** 1-13
- Bergmann W. (1993):** Ernährungsstörungen bei Kulturpflanzen, 3. erw. Aufl. Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart
- Bergmann W., Neubert P. (1976):** Pflanzendiagnose und Pflanzenanalyse. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena
- Bhattacharjee R. B., Sing A., Mukhopadhyay S. N. (2008):** Use of nitrogen-fixing bacteria as biofertiliser for non-legumes: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol* **80** 199-209

- Bielski R. L. (1973):** Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Ann Rev Plant Physiol* **24** 225-252
- Blaaha D., Prigent-Combaret C., Mirza M. S., Moenne-Loccoz Y. (2006):** Phylogeny of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase-encoding gene *acdS* in phytobeneficial and pathogenic proteobacteria and relation with strain biogeography. *FEMS Microbiol Ecol* **56** 455-470
- Bleecker A. B., Kende H. (2000):** Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Ann Rev Cell Dev Biol* **16** 1-18
- Bloemberg G. V., Lugtenberg B. J. J. (2001):** Molecular basis of plant growth promotion and biocontrol by rhizobacteria. *Curr Opin Plant Biol* **4** 343-350
- Bodilis J., Cornelis P. (2009):** A survey of TonB-dependent receptors in fluorescent pseudomonads. *Environ Microbiol Rep* **1** 256-262
- Bosshard P. P., Zbinden R., Abels S., Böddinghaus B., Altwegg M., Böttger E. C. (2006):** 16S rRNA gene sequencing versus the API 20 NE system and the VITEK 2 ID-GNB card for identification of nonfermenting gram-negative bacteria in the clinical laboratory. *J Clin Microbiol* **44** 1359-1366
- Bowen G. D., Rovira A. D. (1976):** Microbial colonization of plant roots. *Ann Rev Phytopathol* **14** 121-144
- Brown M. E. (1974):** Seed and root bacterization. *Ann Rev Phytopathol* **12** 181-197
- Browne P., Rice O., Miller S. H., Burke J., Dowling D. N., Morrissey J. P., O’Gara F. (2009):** Superior inorganic phosphate solubilization is linked to phylogeny within the *Pseudomonas fluorescens* complex. *Appl Soil Ecol* **43** 131-138
- Caballero-Mellado J., Onofre-Lemus J., Estrada-de los Santos E., Martínez-Aguilar L. (2007):** The tomato rhizosphere, an environment rich in nitrogen-fixing *Burkholderia* species with capabilities of interest for agriculture and bioremediation. *Appl Environ Microbiol* **73** 5308-5319
- Castro-Sowinski S., Herschkovitz Y., Okon Y., Jurkevitch E. (2007):** Effects of inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on resident rhizosphere microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* **276** 1-11
- Chang P.-C. (2007):** The use of plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR) and an arbuscular mycorrhizal fungus (AMF) to improve plant growth in saline soils for phytoremediation. Masterarbeit, University of Waterloo, Ontario, Kanada
- Chapon A., Guillerm A.-Y., Delalande L., Lebreton L., Sarniguet A. (2002):** Dominant colonization of wheat by *Pseudomonas fluorescens* Pf29A and selection of the indigenous microflora in the presence of the take-all fungus. *Eur J Plant Pathol* **108** 449-459
- Chen C. R., Condrón L. M., Davis M. R., Sherlock R. R. (2002):** Phosphorous dynamics in the rhizosphere of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and radiata pine (*Pinus radiata* D. Don.). *Soil Biol Biochem* **34** 487-495

Chernin L., Chet I. (2002): Microbial enzymes in the biocontrol of plant pathogens and pests. In: Enzymes in the environment: activity, ecology, and applications. Burns R. G., Dick R. P. (Eds.). Marcel Dekker, New York, U.S.A. 171-225

Chin-A-Woeng T. F. C., de Priester W., van der Bij A. J., Lugtenberg B. J. (1997): Description of the colonization of a gnotobiotic tomato rhizosphere by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strain WCS365, using scanning electron microscopy. Mol Plant-Microbe Interact **10** 79-86

Choi K.-H., Kumar A., Schweizer H. P. (2006): A 10-min method for preparation of highly electrocompetent *Pseudomonas aeruginosa* cells: Application for DNA fragment transfer between chromosomes and plasmid transformation. J Microbiol Methods **64** 391-397

Choi O., Kim J., Kim J.-G., Jeong Y., Moon J. S., Park C. S., Hwang I. (2008): Pyrroloquinoline quinone is a plant growth promotion factor produced by *Pseudomonas fluorescens* B16. Plant Physiol **146** 657-668

Clayton S. J., Read D. B., Murray P. J., Gregory P. J. (2008): Exudation of alcohol and aldehyde sugars from roots of defoliated *Lolium perenne* L. grown under sterile conditions. J Chem Ecol **34** 1411-1421

Cleveland C. C., Townsend A. R., Schimel D. S., Fisher H., Howarth R. W., Hedin L. O., Perakis S. S., Latty E. F., von Fischer J. C., Elseroad A., Wasson M. F. (1999): Global patterns of terrestrial biological nitrogen (N₂) fixation in natural ecosystems. Global Biogeochem Cycles **13** 623-645

Cornelis P. (2010): Iron uptake and metabolism in pseudomonads. Appl Microbiol Biotechnol **86** 1637-1645

Dandurand L.-M., Morra M. J., Chaverra M. H., Orser C. S. (1994): Survival of *Pseudomonas* spp. in air-dried mineral powders. Soil Biol Biochem **26** 1423-1430

De Freitas J. R., Banerjee M. R., Germida J. J. (1997): Phosphate-solubilizing rhizobacteria enhance the growth and yield but not phosphorus uptake of canola (*Brassica napus* L.). Biol Fertil Soils **24** 358-364

Dekkers L. C., van der Bij A. J., Mulders I. H. M., Phoelich C. C., Wentwoord R. A. R., Glandorf D. C. M., Wijffelman C. A., Lugtenberg B. J. J. (1998): Role of the O-antigen of lipopolysaccharide, and possible roles of growth rate and of NADH:ubiquinone oxidoreductase (*nuo*) in competitive tomato root-tip colonization by *Pseudomonas fluorescens* WCS365. Mol Plant-Microbe Interact **11** 763-771

Deubel A., Merbach W. (2005): Influence of microorganisms on phosphorus bioavailability in soils. In: Soil Biology, Vol. 3. Microorganisms in Soil: Roles in Genesis and Functions. Buscot F., Varma A. (Eds.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 177-191

Diekmann R. (2002): Renaturierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie mit geringem zusätzlichen Flächenbedarf am Beispiel der Halde des Kaliwerks Sigmundshall. Kali und Steinsalz **03/2002** 32-41

- Dimkpa C. O., Svatos A., Dabrowska P., Schmidt A., Boland W., Kothe E. (2008):** Involvement of siderophores in the reduction of metal-induced inhibition of auxin synthesis in *Streptomyces* spp. *Chemosphere* **74** 19-25
- DIN EN 1189 : 1996:** Bestimmung von Phosphor - Photometrisches Verfahren mittels Ammoniummolybdat. Normenausschuß Wasserwesen (NAW) im DIN Deutsches Institut für Normung e.V.
- Dobbelaere S., Vanderleyden J., Okon Y. (2003):** Plant growth-promoting effects of diazotrophs in the rhizosphere. *Crit Rev Plant Sci* **22** 107-149
- Dong Y.-H., Xu J.-L., Li X.-H., Zhang L.-H. (2000):** AiiA, an enzyme that inactivates the acylhomoserine lactone quorum-sensing signal and attenuates the virulence of *Erwinia carotovora*. *Proc Natl Acad Sci USA* **97** 3526-3531
- Dratwinski A. (2010):** Charakterisierung der mikrobiellen Population und Untersuchungen zum Quorum Sensing in der Rhizosphäre vom Weidelgras (*Lolium perenne*) auf einer Rückstandshalde der Kaliindustrie. Dissertation, Universität Kassel
- Durrant W. E., Dong X. (2004):** Systemic acquired resistance. *Ann Rev Phytopathol* **42** 185-209
- Dwivedi D., Johri B. N. (2003):** Antifungals from fluorescent pseudomonads: biosynthesis and regulation. *Curr Sci* **85** 1893-1703
- Edwards U., Rogall T., Blöcker H., Emde M., Böttger E. C. (1989):** Isolation and direct complete determination of entire genes. Characterization of a gene coding 16S ribosomal RNA. *Nucleic Acid Res* **17** 7843-7853
- Egamberdiyeva D., Islam K. R. (2008):** Salt-tolerant rhizobacteria: plant growth promoting traits and physiological characterization within ecologically stressed environments. In: Plant-bacteria interactions. Ahmad I., Pichtel J., Hayat S. (Eds.). WILEY-VCH, Weinheim. 257-282
- Ehlers R.-U. (2006):** Einsatz der Biotechnologie im biologischen Pflanzenschutz. *Schreihe Dtsch Phytomed Ges* **8** 17-31
- Euzéby J. P. (1997):** List of bacterial names with standing in nomenclature: a folder available on the Internet. *Int J Syst Bacteriol* **47** 590-592. (List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. <http://www.bacterio.net>)
- Farrelly V., Rainey F. A., Stackebrandt E. (1995):** Effect of genome size and *rrn* gene copy number on PCR amplification of 16S rRNA genes from a mixture of bacterial species. *Appl Environm Microbiol* **61** 2798-2801
- Felsenstein J. (1985):** Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* **39** 783-791
- Fernando W. G. D., Nakkeeran S., Zhang Y. (2005):** Biosynthesis of antibiotics by PGPR and its relation in biocontrol of plant diseases. In: PGPR: Biocontrol and Biofertilization. Siddiqui Z. A. (Ed.). Springer, Dordrecht, Niederlande. 67-109

- Foy C. D., Chaney R. L., White M. C. (1978):** The physiology of metal toxicity in plants. *Annu Rev Plant Physiol* **29** 511-566
- Franche C. F., Lindström K., Elmerich C. (2009):** Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* **321** 35-59
- Fravel D. R. (2005):** Commercialization and implementation of biocontrol. *Ann Rev Phytopathol* **43** 337-359
- Füchslin H. P., Rüegg I., van der Meer J. R., Egli T. (2003):** Effect of integration of a GFP reporter gene on fitness of *Ralstonia eutropha* during growth with 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Environ Microbiol* **5** 878-887
- Gamalero E., Lingua G., Caprì F. G., Fusconi A., Berta G., Lemanceau P. (2004):** Colonization pattern of primary tomato roots by *Pseudomonas fluorescens* A6RI characterized by dilution plating, flow cytometry, fluorescence, confocal and scanning electron microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* **48** 79-87
- Gauthier M. J. (2000):** Environmental parameters associated with the viable but nonculturable state. In: Nonculturable microorganisms in the environment. Colwell R. R., Grimes D. J. (Eds.). ASM Press, Washington D. C., U.S.A. 87-112
- Glick B. R. (2003):** Phytoremediation: synergistic use of plants and bacteria to clean up the environment. *Biotechnol Adv* **21** 383-393
- Glick B. R., Cheng Z., Czarny J., Duan J. (2007):** Promotion of plant growth by ACC deaminase-producing soil bacteria. *Eur J Plant Pathol* **119** 329-339
- Glick B. R., Patten C. L., Holquin G., Penrose D. M. (1999):** Biochemical and genetic mechanisms used by plant growth promoting bacteria. Imperial College Press, London, U.K.
- Glick B. R., Penrose D. M., Li J. (1998):** A model for the lowering of plant ethylene concentrations by plant growth-promoting bacteria. *J Theor Biol* **190** 63-68
- Glickmann E., Dessaux Y. (1995):** A critical examination of the specificity of the Salkowski reagent for indolic compounds produced by phytopathogenic bacteria. *Appl Environ Microbiol* **61** 793-796
- Goldstein A. H., Braverman K., Osorio N. (1999):** Evidence for mutualism between a plant growing in a phosphate-limited desert environment and a mineral phosphate solubilizing (MPS) rhizobacterium. *FEMS Microbiol Ecol* **30** 295-300
- Govindasamy V., Senthilkumar M., Gaikwad K., Annapurna K. (2008):** Isolation and characterization of ACC deaminase gene from two plant growth-promoting rhizobacteria. *Curr Microbiol* **57** 312-317
- Götz M., Gomes N. C. M., Dratwinski A., Costa R., Berg G., Peixoto R., Mendonça-Hagler L., Smalla K. (2006):** Survival of *gfp*-tagged antagonistic bacteria in the rhizosphere of tomato plants and their effects on the indigenous bacterial community. *FEMS Microbiol Ecol* **56** 207-218

- Grandlic C. J., Mendez M. O., Chorover J., Machado B., Maier R. M. (2008):** Plant growth-promoting bacteria for phytostabilization of mine tailings. *Environ Sci Technol* **42** 2079-2084
- Grandlic C. J., Palmer M. W., Maier R. M. (2009):** Optimization of plant growth-promoting bacteria-assisted phytostabilization of mine tailings. *Soil Biol Biochem* **41** 1734-1740
- Greenwald J., Zeder-Lutz G., Hagege A., Celia H., Pattus F. (2008):** The metal dependence of pyoverdins interactions with its outer membrane receptor FpvA. *J Bacteriol* **190** 6548-6558
- Gregory P. J. (2006):** Roots, rhizosphere and soil: the route to a better understanding of soil science? *Eur J Soil Sci* **57** 2-12
- Guerinot M. L. (1994):** Microbial iron transport. *Ann Rev Microbiol* **48** 743-772
- Gulati A., Rahi P., Vyas P. (2008):** Characterization of phosphate-solubilizing fluorescent pseudomonads from the rhizosphere of Seabuckthorn growing in the cold deserts of Himalayas. *Curr Microbiol* **56** 73-79
- Gupta A., Meyer J. M., Goel R. (2002):** Development of heavy metal-resistant mutants of phosphate solubilizing *Pseudomonas* sp. NBRI 4014 and their characterization. *Curr Microbiol* **45** 323-327
- Gyaneshwar P., Naresh Kumar G., Parekh L. J. (1998):** Effect of buffering on the phosphate-solubilizing ability of microorganisms. *World J Microbiol Biotechnol* **14** 669-673
- Gyaneshwar P., Naresh Kumar G., Parekh L. J., Poole P. S. (2002):** Role of soil microorganisms in improving P nutrition of plants. *Plant Soil* **245** 83-93
- Haagensen J. A. J., Hansen S. K., Johansen T., Molin S. (2002):** In situ detection of horizontal transfer of mobile genetic elements. *FEMS Microbiol Ecol* **42** 261-268
- Hall T.A. (1999):** BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp Ser* **41** 95-98
- Hansen M., Kragelund L., Nybroe O., Sørensen J. (1997):** Early colonization of barley roots by *Pseudomonas fluorescens* studied by immunofluorescence technique and confocal laser scanning microscopy. *FEMS Microbiol Ecol* **23** 353-360
- Hartmann A., Schmid M., van Tuinen D., Berg G. (2009):** Plant-driven selection of microbes. *Plant Soil* **321** 235-257
- Hermesmeyer D., Diekmann R., van der Ploeg R. R., Horton R. (2002a):** Physical properties of a soil substitute derived from an aluminum recycling by-product. *J Hazard Mater* **95** 107-124
- Hermesmeyer D., Ilseman J., Bachmann J., van der Ploeg R. R., Horton R. (2002b):** Model calculations of water dynamics in lysimeters filled with granular industrial wastes. *J Plant Nutr Soil Sci* **165** 339-346

- Hermesmeyer D., van der Ploeg R. R., Horton R., Bachmann J. (2002c):** Lysimeter study of water and salt dynamics in a saline metallurgical waste. *J Plant Nutr Soil Sci* **165** 211-219
- Hiltner L. (1904):** Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiete der Bodenbakteriologie unter besonderer Berücksichtigung der Gründüngung und Brache. *Arb Dtsch Landwirtsch Ges Berl* **98** 59-78
- Hinsinger P. (2001):** Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant Soil* **237** 173-195
- Höfte M., Seong K. Y., Jurkevitch E., Verstraete W. (1991):** Pyoverdine production by the plant-growth beneficial *Pseudomonas* strain 7NSK₂: Ecological significance in soil. *Plant Soil* **130** 249-257
- Honma M., Shimomura T. (1978):** Metabolism of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid. *Agric Biol Chem* **42** 1825-1831
- Hontzeas N., Richardson A. O., Belimov A. A., Safranov V. I., Abu-Omar M. M., Glick B. R. (2005):** Evidence for horizontal gene transfer (HGT) of ACC deaminase genes. *Appl Environ Microbiol* **71** 7556-7558
- Huang Y., Xu C., Ma L., Zhang K., Duan C., Mo M. (2010):** Characterisation of volatiles produced from *Bacillus megaterium* YFM3.25 and their nematocidal activity against *Meloidogyne incognita*. *Eur J Plant Pathol* **126** 417-422
- Igual J. M., Valverde A., Cervantes E., Velázquez E. (2001):** Phosphate-solubilizing bacteria as inoculants for agriculture: use of updated molecular techniques in their study. *Agronomie* **21** 561-568
- Illmer P., Schinner F. (1992):** Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soil. *Soil Biol Biochem* **24** 389-395
- Inbar E., Green S. J., Hadar Y., Minz D. (2005):** Competing factors of compost concentration and proximity to root affect the distribution of Streptomycetes. *Microbiol Ecol* **50** 73-81
- Jendrossek D. (2001):** Transfer of [*Pseudomonas*] *lemoignei*, a gram-negative rod with restricted catabolic capacity, to *Paucimonas* gen. nov. with one species, *Paucimonas lemoignei* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **51** 905-908
- Johnston H. W. (1952):** The solubilization of phosphate: the action of various organic compounds on dicalcium and tricalcium phosphate. *New Zealand J Sci Technol* **33** 436-444
- Johri J. K., Surange S., Nautiyal C. S. (1999):** Occurrence of salt, pH, and temperature-tolerant, phosphate-solubilizing bacteria in alkaline soils. *Curr Microbiol* **39** 89-93
- Joseph S., Jisha M. S. (2009):** Buffering reduces phosphate solubilizing ability of selected strains of bacteria. *World J Agric Sci* **5** 135-137

- Jousset A., Scheu S., Bonkowski M. (2008):** Secondary metabolite production facilitates establishment of rhizobacteria by reducing both protozoan predation and the competitive effects of indigenous bacteria. *Funct Ecol* **22** 714-719
- K+S Aktiengesellschaft (2008):** Unternehmens-/Nachhaltigkeitsbericht
- Kamala-Kannan S., Lee K.-J., Park S.-M., Chae J.-C., Yun B.-S., Lee Y. H., Park Y.-J., Oh B.-T. (2010):** Characterization of ACC deaminase gene in *Pseudomonas entomophila* strain PS-PJH isolated from the rhizosphere soil. *J Basic Microbiol* **50** 1-6
- Kamilova F., Validov S., Azarova T., Mulders I., Lugtenberg B. (2005):** Enrichment for enhanced competitive plant root tip colonizers selects for a new class of biocontrol bacteria. *Environ Microbiol* **7** 1809-1817
- Kämpfer P. (2006):** The family *Streptomycetaceae*, Part I: Taxonomy. In: The Prokaryotes, 3rd Ed., Vol. 3, *Archaea*, Bacteria: *Firmicutes*, Actinomycetes. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (Eds.). Springer, New York, U.S.A. 538-604
- Karthikeyan S., Zhou Q., Zhao Z., Kao C. L., Tao Z., Robinson H., Liu H. W., Zhang H. (2004):** Structural analysis of *Pseudomonas* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase complexes: insight into the mechanism of a unique pyridoxal-5-phosphate dependent cyclopropane ring-opening reaction. *Biochem* **43** 13328-13339
- Keel C., Schiner U., Maurhofer M., Voisard C., Laville J., Burger U., Wirthner P., Haas D., Defago G. (1992):** Suppression of root diseases by *Pseudomonas fluorescens* CHA0: Importance of the bacterial secondary metabolite 2,4- Diacetylphloroglucinol. *Mol Plant-Microbe Interact* **5** 4-13
- Kessler B., de Lorenzo V., Timmis K. N. (1992):** A general system to integrate *lacZ* fusions into the chromosomes of gram negative eubacteria: regulation of the *Pm* promoter in the TOL plasmid studied with all controlling elements in monocopy. *Mol Gen Genet* **233** 293-301
- Kimura M. (1980):** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J Mol Evol* **16** 111-120
- Khan M. S., Zaidi A., Wani P. A. (2007):** Role of phosphate-solubilizing microorganisms in sustainable agriculture - A review. *Agron Sustain Dev* **27** 29-43
- Khan M. S., Zaidi A., Wani P. A., Oves M. (2009):** Role of plant growth promoting rhizobacteria in the remediation of metal contaminated soils. *Environ Chem Lett* **7** 1-19
- Kloepper, J. W. (1994):** Plant growth-promoting rhizobacteria (other systems). In: *Azospirillum*/Plant Associations. Okon, Y. (Ed.). CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. 137-166
- Kloepper J. W., Gutiérrez-Estrada A., McInroy J. A. (2007):** Photoperiod regulates elicitation of growth promotion but not induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria. *Can J Microbiol* **53** 159-167
- Kloepper J. W., Leong J., Teintze M., Schroth M. N. (1980):** Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* **286** 885-886

- Kloepper J. W., Schroth M. N. (1978):** Plant growth promoting rhizobacteria on radish. In: Proc 4th Int Conf Plant Pathogenic Bacteria, Vol. 2. Gilbert-Clarey, Tours, Frankreich. 879-882
- Koch S. (2007):** Charakterisierung von pflanzenwachstumsfördernden Rhizobakterien einer Rückstandshalde der Kaliindustrie unter besonderer Berücksichtigung der Phosphatsolubilisierung. Unveröffentlichte Diplomarbeit, Universität Kassel
- Latour X., Delorme S., Mirleau P., Lemanceau P. (2003):** Identification of traits implicated in the rhizosphere competence of fluorescent pseudomonads: description of a strategy based on population and model strain studies. *Agronomie* **23** 397-405
- Li J., Ovakim D. H., Charles T. C., Glick B. R. (2000):** An ACC deaminase minus mutant of *Enterobacter cloacae* UW4 no longer promotes root elongation. *Curr Microbiol* **41** 101-105
- Lindsay W. L. (1979):** Chemical equilibria in soils. Wiley, New York, U.S.A.
- Locatelli L., Tarnawski S., Hamelin J., Rossi P., Aragno M. (2002):** Specific PCR amplification for the genus *Pseudomonas* targeting the 3' half of the 16S rDNA and the whole 16S–23S rDNA spacer. *System Appl Microbiol* **25** 220-227
- Loper J. E., Henkels M. D. (1999):** Utilization of heterologous siderophores enhances levels of iron available to *Pseudomonas putida* in the rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **65** 5357-5363
- Lucy M., Reed E., Glick B. R. (2004):** Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **86** 1-25
- Lugtenberg B. J. J., Dekkers L. (1999):** What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environ Microbiol* **1** 9-13
- Lugtenberg B. J. J., Chin-A-Wong T. F. C., Bloemberg G. V. (2002):** Microbe-plant interactions: principles and mechanisms. *Antonie van Leeuwenhoek* **81** 373-383
- Lugtenberg B. J. J., Dekkers L., Bloemberg G. V. (2001):** Molecular determinants of rhizosphere colonization by *Pseudomonas*. *Annu Rev Phytopathol* **39** 461-490
- Lynch J. M., Whipps J. M. (1990):** Substrate flow in the rhizosphere. *Plant Soil* **129** 1-10
- Majewski E. (2005):** Untersuchungen zur Mikroflora und ihrer Sukzession im Boden einer Rückstandshalde der Kaliindustrie. Unveröffentlichte Diplomarbeit, Universität Kassel
- McDonnell L., Plett J. M., Andersson-Gunnerås S., Kozela C., Dugardeyn J., van der Straeten D., Glick B. R., Sundberg B., Regan S. (2009):** Ethylene levels are regulated by a plant encoded 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase. *Physiol Plant* **136** 94-109
- Miller J. H. (1972):** Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.

- Miller S. H., Browne P., Prigent-Combaret C., Combes-Meynet E., Morrissey J. P., O’Gara F. (2010):** Biochemical and genomic comparison of inorganic phosphate solubilization in *Pseudomonas* species. *Environ Microbiol Reports* **2** 403-411
- Moore E. R. B., Tindall B. J., Martins dos Santos V. A. P., Pieper D. H., Ramos J.-L., Palleroni N. J. (2006):** Nonmedical: *Pseudomonas*. In: *The Prokaryotes*, 3rd Ed., Vol. 6, *Proteobacteria: Gamma subclass*, Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (Eds.). Springer, New York, U.S.A. 646-703
- Morgan P. W., Drew C. D. (1997):** Ethylene and plant responses to stress. *Physiol Plant* **100** 620-630
- Nakkeeran S., Dilantha W. G., Siddiqui Z. A. (2005):** Plant growth promoting rhizobacteria formulations and its scope in commercialization for the management of pests and diseases. In: *PGPR: Biocontrol and biofertilization*. Siddiqui Z. A. (Ed.). Springer, Dordrecht, Niederlande. 257-296
- Nautiyal C. S. (1999):** An efficient microbiological growth medium for screening phosphate solubilizing microorganisms. *FEMS Microbiol Lett* **170** 265-270
- Nautiyal C. S., Bhadauria S., Kumar P., Lal H., Mondal R., Verma D. (2000):** Stress induced phosphate solubilization in bacteria isolated from alkaline soils. *FEMS Microbiol Lett* **182** 291-296
- Nei M., Kumar S. (2000):** Molecular evolution and phylogenetics. Oxford University Press, New York, U.S.A.
- Niessing, S. (2005):** Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 6 - Begrünungsmaßnahmen auf der Rückstandshalde des Kaliwerkes - Sigmundshall in Bokeloh. *Ökologie und Umweltsicherung* 25/2005, Universität Kassel, Fachgebiet Landschaftsökologie und Naturschutz
- Normander B., Henderiksen N. B., Nybroe O. (1999):** Green fluorescent protein-marked *Pseudomonas fluorescens*: localization, viability, and activity in the natural barley rhizosphere. *Appl Environ Microbiol* **65** 4646-4651
- Oberländer H.-E., Roth K. (1978):** Die Wirkung der Schwermetalle Chrom, Nickel, Kupfer, Zink, Cadmium, Quecksilber und Blei auf die Aufnahme von Verlagerung von Kalium und Phosphat bei jungen Gerstenpflanzen. *Z Pflanzenernaehr Bodenkd* **141** 107-116
- Oliver J. D. (2005):** The viable but notculturable state in bacteria. *Jour Microbiol* **43** 93-100
- Patten C. L., Glick B. R. (2000):** Isolation and characterization of indoleacetic acid biosynthesis genes from plant growth-promoting bacteria. *Proceedings of the Fifth PGPR Workshop*
- Peixoto R., Götz M., Milling A., Berg G., Costa R., Rosado A., Mendonça-Hagler L., Smalla K. (2004):** Monitoring gfp-tagged bacterial antagonists in the rhizosphere of tomato plants. In: *IOBC wprs Bulletin*. Sikora R. A., Gowen S., Hauschil R., Kiewnick S. (Eds.). Rom, Italien. 219-224

- Penrose D. M., Glick B. R. (2003):** Methods for isolating and characterizing ACC deaminase-containing plant growth-promoting rhizobacteria. *Physiol Plant* **118** 10-15
- Pilet P. E., Chollet R. (1970):** Sur le dosage colorimétrique de l'acide indolylacétique. *C R Acad Sci Ser* **271** 1675-1678
- Pimentel D. (1995):** Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *J Agric Ethics* **8** 17-29
- Pincus D. H. (2006):** Microbial identification using the BioMérieux VITEK® 2 System. In: *Encyclopedia of rapid microbiological methods*, Vol. II. Miller M. J. (Ed.). PDA/DHI
- Podile A. R., Kishore A. K. (2007):** Plant growth-promoting rhizobacteria. In: *Plant-associated bacteria*. Gnanamanickam S. S. (Ed.). Springer, Dordrecht, Niederlande. 195-230
- Raaijmakers J. M., Paulitz C. T., Steinberg C., Alabouvette C., Moëgne-Loccoz Y. (2009):** The rhizosphere: a playground and battlefield for soilborne pathogens and beneficial microorganisms. *Plant Soil* **321** 341-361
- Rzhetsky A., Nei M. (1992):** A simple method for estimating and testing minimum evolution trees. *Mol Biol Evol* **9** 945-967
- Richardson A. E., Barea J.-M., McNeill A. M., Prigent-Combaret C. (2009):** Acquisition of phosphorus and nitrogen in the rhizosphere and plant growth promotion by microorganisms. *Plant Soil* **321** 305-339
- Rodríguez H., Fraga R. (1999):** Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnol Adv* **17** 319-339
- Rodríguez H., Fraga R., Gonzalez T., Bashan Y. (2006):** Genetics of phosphate solubilization and its potential applications for improving plant growth-promoting bacteria. *Plant Soil* **287** 15-21
- Ryu C. M., Farag M. A., Hu C. H., Reddy M. S., Wei H. X., Paré P. W., Kloepper J. W. (2003):** Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** 4927-4932
- Saitou N., Nei M. (1987):** The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4** 406-425
- Saleh-Lakha S., Glick B. R. (2007):** Plant growth-promoting rhizobacteria. In: *Modern Soil Microbiology*, 2nd Ed. Van Elsas J. D., Jansson J. K., Trevors J. T. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. 503-520
- Sambrook J., Russel D. W. (2001):** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
- Sands D. C., Gleason F. H., Hildebrand D. C. (1967):** Cytochromes of *Pseudomonas syringae*. *J Bacteriol* **94** 1785-1786

- Saravanakumar D., Samiyappan R. (2007):** ACC deaminase from *Pseudomonas fluorescens* mediated saline resistance in groundnut (*Arachis hypogea*) plants. J Appl Microbiol **102** 1283-1292
- Scheer, T. (2001):** Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 4 - Untersuchungen zur Nutzbarkeit aufbereiteter Salzschlacke der Sekundäraluminium-Industrie als Rekultivierungsmaterial einer Kali-Rückstandshalde. Ökologie und Umweltsicherung 21/2001, Universität – Gesamthochschule Kassel, Fachbereich Landwirtschaft, Internationale Agrarentwicklung und Ökologische Umweltsicherung
- Scheffer F., Schachtschabel P. (2002):** Lehrbuch der Bodenkunde, 15. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin
- Schippers B., Bakker A. W., Bakker P. A. H. M. (1987):** Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Ann Rev Phytopathol **25** 339-358
- Schmeisky H., Kunick M., Lenz O. (1993):** Zur Begrünung von Rückstandshalden der Kaliindustrie. Kali und Steinsalz **11** 132-152
- Schmeisky H., Lenz O. (1998):** Zur Begrünung von Rückstandshalden der Kaliindustrie – Ergebnisse einer 25jährigen Forschungsarbeit. Sonderdruck aus Glückauf mit Kali und Steinsalz **134** 501-515
- Schwyn B., Neilands J. B. (1987):** Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. Anal Biochem **160** 47-56
- Sheng X. F. (2005):** Growth promotion and increased potassium uptake of cotton and rape by a potassium releasing strain of *Bacillus edaphicus*. Soil Biol Biochem **37** 1918-1922
- Simons M., van der Bij A. J., Brand I., de Weger L. A., Wijffelman C. A., Lugtenberg B. J. J. (1996):** Gnotobiotic system for studying rhizosphere colonization by plant growth-promoting *Pseudomonas* bacteria. Mol Plant-Microbe Interact **9** 600-607
- Smith F. W. (2002):** The phosphate uptake mechanism. Plant Soil **245** 105-114
- Spaepen S., Vanderleyen J., Remans R. (2007):** Indole-3-acetic acid in microbial and microorganism-plant signaling. FEMS Microbiol Rev **31** 425-448
- Stevenson F. J., Cole M. A. (1999):** Cycles of soil - carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients, 2nd Ed. Wiley, New York, U.S.A.
- Strange R. N., Scott P. R. (2005):** Plant disease: a threat to global food security. Ann Rev Phytopathol **43** 83-116
- Tamura K., Dudley J., Nei M., Kumar S. (2007):** MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol Biol Evol **24** 1596-1599
- Tilak K. V. B. R., Ranganayaki N., Pal K. K., De R., Saxena A. K., Nautiyal C. S., Mittal S., Tripathi A. K., Johri B. N. (2005):** Diversity of plant growth and soil health supporting bacteria. Curr Sci **89** 136-150

- Torrent J., Barberis E., Gil-Sotres F. (2007):** Agriculture as a source of phosphorus for eutrophication in southern Europe. *Soil Use Manage* **23** 25-35
- Towner K. (2006):** The Genus *Acinetobacter*. In: *The Prokaryotes*, 3rd Ed., Vol. 6, *Proteobacteria: Gamma subclass*. Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K.-H., Stackebrandt E. (Eds.). Springer, New York, U.S.A. 676-758
- Trevors J. T., Kuikman P., van Elsas J. D. (1994):** Release of bacteria into soil: cell numbers and distribution. *J Microbiol Meth* **19** 247-259
- Trivedi P., Pandey A. (2008):** Recovery of plant growth-promoting rhizobacteria from sodium alginate beads after 3 years following storage at 4°C. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35** 205-209
- Ueno D., Rombolà A. D., Iwashita T., Nomoto K., Ma J. F. (2007):** Identification of two novel phytosiderophores secreted by perennial ryegrass. *New Phytologist* **173** 304-310
- Vamerali T., Bandiera M., Mosca G. (2010):** Field crops for phytoremediation of metal-contaminated land. A review. *Environ Chem Lett* **8** 1-17
- Van Loon L. C. (2007):** Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* **119** 243-254
- Van Loon L. C., Bakker P. A. H. M., Pieterse C. M. J. (1998):** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Ann Rev Phytopathol* **36** 453-483
- Vancanneyt M., Witt S., Abraham W.-R., Kersters K., Fredrickson H. L. (1996):** Fatty acid content in whole-cell hydrolysates and phospholipid fractions of pseudomonads: A taxonomic evaluation. *System Appl Microbiol* **19** 528-540
- Velusamy P., Gnanamanickam S. S. (2003):** Identification of 2,4-diacetylphloroglucinol production by plant-associated bacteria and its role in suppression of rice bacterial blight in India. *Curr Sci* **85** 1270-1273
- Versalovic J., Koeuth T., Lupski J. R. (1991):** Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucl Acids Res* **19** 6823-6831
- Veselova M. A. (2010):** Quorum sensing regulation in *Pseudomonas*. *Russian Journal Genetics* **46** 129-137
- Vessey J. K. (2003):** Plant growth-promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* **255** 571-586
- Viterbo A., Landau U., Kim S., Chernin L., Chet I. (2010):** Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent *Trichoderma asperellum* T203. *FEMS Microbiol Lett* **305** 42-48
- Vyas P., Gulati A. (2009):** Organic acid production in vitro and plant growth promotion in maize under controlled environment by phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas*. *BMC Microbiology* **9** 174

- Vyas P., Rahi P., Gulati A. (2009):** Stress tolerance and genetic variability of phosphate-solubilizing fluorescent *Pseudomonas* from the cold deserts of the Trans-Himalayas. *Microb Ecol* **58** 425-434
- Wang L., Jayarao B. M. (2001):** Phenotypic and genotypic characterization of *Pseudomonas fluorescens* isolated from bulk tank milk. *J Dairy Sci* **84** 1421-1429
- Wang C. X., Ramette A., Punjasamarnwong P., Zala M., Natsch A., Moënne-Loccoz Y., Défago G. (2001):** Cosmopolitan distribution of *phlD*-containing dicotyledonous crop-associated biocontrol pseudomonads of worldwide origin. *FEMS Microbiol Ecol* **37** 105-116
- Weller D. M. (1988):** Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann Rev Phytopathol* **26** 379-407
- Weller D. M. (2007):** *Pseudomonas* biocontrol agents of soilborne pathogens: looking back over 30 years. *Phytopathology* **97** 250-256
- Weller D. M., Landa B. B., Mavrodi O. V., Schroeder K. L., de la Fuente L., Blouin Bankhead S., Allende Molar R., Bonsall R. F., Mavrodi D. V., Thomashow L. S. (2007):** Role of 2,4-diacetylphloroglucinol-producing fluorescent *Pseudomonas* spp. in the defense of plant roots. *Plant Biol* **9** 4-20
- Weyers J. D. B., Paterson N. W. (2001):** Plant hormones and the control of physiological processes. *New Phytologist* **152** 375-407
- Whipps J. M. (2001):** Microbial interactions and biocontrol in the rhizosphere. *J Exp Bot* **52** 487-511
- Whipps J. M., Gerhardson B. (2007):** Biological pesticides for control of seed- and soil-borne plant pathogens. In: *Modern Soil Microbiology*, 2nd Ed. Van Elsas J. D., Jansson J. K., Trevors J. T. (Eds.). CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. 479-501
- Whitelaw M. A., Harden T. J., Helyar K. R. (1999):** Phosphate solubilisation in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol Biochem* **31** 655-665
- Whiting P. H., Midgley M., Daws E. A. (1976):** The regulation of transport of glucose, gluconate and 2-oxogluconate and of glucose catabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem J* **154** 659-668
- Widmer F., Seidler R. J., Gillevet P. M., Watrud L. S., Di Giovanni G. D. (1998):** A highly selective PCR protocol for detecting 16S rRNA genes of the genus *Pseudomonas* (sensu stricto) in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* **64** 2545-2553
- Wöhler, V. (1999):** Aufbereitete Aluminium-Salzschlacke als Rekultivierungsmaterial – Untersuchungen zum Stoff- und Wasserhaushalt eines salzhaltigen Rekultivierungsmaterials im Labor und Freiland. Inaugural-Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktor-Ingenieur, Fachgebiet Bodenkunde am Fachbereich Landwirtschaft, Internationale Agrarentwicklung und Ökologische Umweltsicherung der Universität Gesamthochschule Kassel. urn:nbn:de:hebis:34-304

- Woodward A. W., Bartel B. (2005):** Auxin: regulation, action and interaction. *Ann Bot* **95** 707-735
- Yamamoto S., Kasai H., Arnold D. L., Jackson R. W., Vivian A., Harayama S. (2000):** Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intrageneric structure reconstructed from the nucleotide sequenced of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* **146** 2385-2394
- Yao J. C. D., Moellering Jr. R. C. (1999):** Antibacterial agents. In: Manual of Clinical Microbiology, 7th Ed. Murray P. R., Baron E. J., Pfaller M. A., Tenover F. C., Tenover R. H. (Eds.). ASM Press, Washington D.C., U.S.A. 1474-1504
- Young C.-C., Rekha P. D., Lai W.-A., Arun A. B. (2006):** Encapsulation of plant growth-promoting bacteria in alginate beads enriched with humic acid. *Biotechnol Bioeng* **95** 76-83
- Zachow C., Pirker H., Westendorf C., Tilcher R., Berg G. (2009):** The *Caenorhabditis elegans* assay: a tool to evaluate the pathogenic potential of bacterial biocontrol agents. *Eur J Plant Pathol* **125** 367-376
- Zhang L., Birch R. G. (1997):** Mechanisms of biocontrol by *Pantoea dispersa* of sugar cane leaf scald disease caused by *Xanthomonas albilineans*. *J Appl Microbiol* **82** 448-454
- Zhang Z., Schwartz S., Wagner L., Miller W. (2000):** A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* **7** 203-214

Anhang

Tab. 22: Datenbankabgleich der 16S rDNA-Sequenz der vier Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8

Aufgelistet sind alle Sequenzen mit einer Homologie von über 99% (Zugriff am 27.01.10)

Accession No.	Beschreibung
FN547411.1	<i>Pseudomonas</i> sp. G68 partial 16S rRNA gene, strain G68
GQ253929.1	<i>Pseudomonas</i> sp. P11(2009b) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GQ253927.1	<i>Pseudomonas</i> sp. P8(2009) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
GQ077826.1	Uncultured bacterium clone nbw1162c01c1 16S ribosomal RNA gene, partial seq.e
EU449582.1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone Plot4-C05 16S ribosomal RNA gene, partial seq.
EU449578.1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone Plot4-2F04 16S ribosomal RNA gene, partial seq.
EU449577.1	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp. clone Plot4-2E06 16S ribosomal RNA gene, partial seq.
FJ262367.1	<i>Pseudomonas</i> sp. WH12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
FJ225306.1	<i>Pseudomonas</i> sp. TAD163 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EU781734.1	<i>Pseudomonas</i> sp. VET-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EU391388.2	<i>Pseudomonas</i> sp. CIP 109457 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EU236736.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Z4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AM900685.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> partial 16S rRNA gene, strain SCAM BA_1
EF540490.1	<i>Pseudomonas</i> sp. 4_C7/16_5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF487999.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain P13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF153018.1	<i>Pseudomonas corrugata</i> strain P94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044371.1	<i>Pseudomonas</i> sp. S7-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044370.1	<i>Pseudomonas</i> sp. C6-16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044369.1	<i>Pseudomonas</i> sp. C6-9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044368.1	<i>Pseudomonas</i> sp. S7-46 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044367.1	<i>Pseudomonas</i> sp. S7-29 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044366.1	<i>Pseudomonas</i> sp. S8-151 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044362.1	<i>Pseudomonas</i> sp. S7-52 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044357.1	<i>Pseudomonas</i> sp. K94.38 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
EF044353.1	<i>Pseudomonas</i> sp. C6-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
DQ478945.1	<i>Pseudomonas</i> sp. QLX11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
DQ473439.1	<i>Pseudomonas fluorescens</i> strain Pf29A 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ453838.1	<i>Pseudomonas</i> sp. P96.25 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ453837.1	<i>Pseudomonas</i> sp. K93.3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ453836.1	<i>Pseudomonas</i> sp. C*1A1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ453835.1	<i>Pseudomonas</i> sp. TM1A3 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ453822.1	<i>Pseudomonas</i> sp. P97.30 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ453820.1	<i>Pseudomonas</i> sp. K94.37 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ453819.1	<i>Pseudomonas</i> sp. K94.31 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ453818.1	<i>Pseudomonas</i> sp. K93.2 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
DQ241591.1	<i>Pseudomonas</i> sp. DDT-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AY271792.1	<i>Pseudomonas aurantiaca</i> VKM B-1524 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AY512624.1	<i>Pseudomonas</i> sp. A1Y13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AY308042.1	<i>Pseudomonas</i> sp. AZ18L2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
DQ377772.1	<i>Pseudomonas kilonensis</i> isolate PD 31 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
DQ377746.1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> isolate PD 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
DQ377745.1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> isolate PD 4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AY618572.1	<i>Pseudomonas</i> sp. BC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AF456219.1	<i>Pseudomonas</i> sp. S55-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AF456215.1	<i>Pseudomonas</i> sp. New10530 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
AJ417074.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Q65c-80 16S rRNA gene, strain Q65c-80
AJ417069.1	<i>Pseudomonas</i> sp. Q37-87 16S rRNA gene, strain Q37-87
AJ417068.1	<i>Pseudomonas</i> sp. CM1'A2 16S rRNA gene, strain CM1'A2
AJ292381.1	<i>Pseudomonas brassicacearum</i> 16S rRNA gene, strain 520-1

Tab. 23: Einzelreaktionen der Isolate 1.8, 2.2, 2.5 und 2.8 in API 20 NE

-) negative Reaktion, +) positive Reaktion, (+)) nach Inkubationszeit von 4 d

Nachweisreaktion	Isolat			
	1.8	2.2	2.5	2.8
Nitratreduktion zu Stickstoff	+	+	+	+
Indolbildung aus L-Tryptophan	-	-	-	-
Fermentation von D-Glucose	-	-	-	-
Gelatinase-Aktivität	+	+	+	+
Arginindihydrolyase-Aktivität	(+)	(+)	(+)	(+)
Urease-Aktivität	-	-	-	-
β -Glucosidase-Aktivität	-	-	-	-
β -Galactosidase-Aktivität	-	-	-	-
Assimilation von D-Glukose	+	+	+	+
Assimilation von L-Arabinose	+	+	+	+
Assimilation von D-Mannose	+	+	+	+
Assimilation von D-Mannitol	+	+	+	+
Assimilation von N-Acetyl-Glucosamin	-	-	-	-
Assimilation von D-Maltose	-	-	-	-
Assimilation von Kaliumgluconat	+	+	+	+
Assimilation von Caprinsäure	+	+	+	+
Assimilation von Adipinsäure	-	-	-	-
Assimilation von Apfelsäure	+	+	+	+
Assimilation von Trinatriumcitrat	+	+	+	+
Assimilation von Phenylacetat	-	+	+	+

API-Profil des Isolats 1.8 (nach 1 d/4 d): **1057455 / 1157455**API-Profil der Isolate 2.2-2.8 (nach 1 d/4 d): **1057457 / 1157457**

Tab. 24: Erster Gewächshausversuch, Rohdaten (100 d)

FS) oberirdische Frischmasse, TS) oberirdische Trockenmasse, a) Prozentualer Anteil der oberirdischen TS [%], b) Menge in der oberirdischen TS [mg], c) Gehalt in der oberirdischen TS [mg pro 100 g], nb) nicht bestimmt

Variante	Topf	FS [g]	TS [g]	Stickstoff (N)		Phosphor (P)		Kalium (K)		Magnesium (Mg)	
				a	b	c	b	c	b	c	b
1.A	1	15,2	2,8	4,01	112,28	168,1	4,71	4586,9	128,4	601,8	16,9
	2	9,5	2,2	3,90	85,80	105,4	2,32	2968,0	65,3	353,7	7,8
	3	14,9	2,7	4,09	110,43	157,3	4,25	3861,8	104,3	528,1	14,3
	4	11,1	1,2	3,93	47,16	147,8	1,77	3576,7	42,9	471,6	5,7
	5	22,2	4,0	3,79	151,60	183,9	7,36	3658,1	146,3	509,0	20,4
1.B	6	31,3	5,6	3,62	202,72	172,2	9,64	3588,9	201,0	422,0	23,6
	7	31,5	6,5	3,57	232,05	165,7	10,77	3622,4	235,5	449,8	29,2
	8	29,8	5,8	3,62	209,96	154,0	8,93	3822,0	221,7	478,6	27,8
	9	27,6	5,2	3,62	188,24	144,0	7,49	3557,6	185,0	538,8	28,0
	10	26,6	5,7	3,57	203,49	148,7	8,48	nb	nb	nb	nb
1.C	11	32,0	6,8	3,52	239,36	174,3	11,85	3505,0	238,3	497,7	33,8
	12	38,1	8,0	3,50	280,00	180,4	14,43	3826,8	306,1	511,1	40,9
	13	22,9	5,1	3,30	168,30	118,5	6,04	3646,1	186,0	523,9	26,7
	14	36,1	7,5	3,43	257,25	165,0	12,38	4003,2	300,2	514,0	38,6
	15	35,0	7,2	3,63	261,36	189,5	13,64	4653,4	335,0	652,8	47,0
1.D	16	36,9	7,5	3,49	261,75	171,6	12,87	4373,7	328,0	600,1	45,0
	17	45,9	9,3	3,56	331,08	148,7	13,83	4148,7	385,8	561,3	52,2
	18	40,7	8,7	3,55	308,85	172,4	15,00	4189,5	364,5	572,1	49,8
	19	43,7	9,4	3,70	347,80	162,8	15,30	4016,3	377,5	552,0	51,9
	20	41,0	8,8	3,58	315,04	151,1	13,30	nb	nb	nb	nb
1.E	21	37,5	6,5	3,62	235,30	189,5	12,32	4504,1	292,8	627,3	40,8
	22	31,9	6,9	3,54	244,26	144,7	9,98	3560,0	245,6	505,0	34,8
	23	32,3	6,6	3,21	211,86	135,3	8,93	3253,2	214,7	421,9	27,8
	24	30,8	6,2	3,71	230,02	165,4	10,25	4247,5	263,3	585,2	36,3
	25	33,3	6,7	3,51	235,17	144,9	9,71	4784,6	320,6	615,4	41,2
1.F	26	29,3	5,7	3,28	186,96	140,9	8,03	4360,8	248,6	619,1	35,3
	27	39,7	8,4	3,46	290,64	153,0	12,85	3822,0	321,0	529,0	44,4
	28	21,7	4,6	2,86	131,56	127,9	5,88	3113,9	143,2	399,8	18,4
	29	23,3	4,9	3,65	178,85	146,8	7,19	3389,4	166,1	427,6	21,0
	30	32,3	8,6	3,21	276,06	145,8	12,54	3398,1	292,2	410,9	35,3

Tab. 25: Zweiter Gewächshausversuch, Rohdaten (105, 135, 217 d)

FS) Frischmasse, TS) Trockenmasse, a) Prozentualer Anteil der oberirdischen TS [%], b) Menge in der oberirdischen TS [mg], c) Gehalt in der oberirdischen TS [mg pro 100 g], nb) nicht bestimmt

Variante	Topf	oberirdische Biomasse (105 d)						oberirdische Biomasse (135 d)		Wurzelmasse (217 d)
		FS [g]	TS [g]	Stickstoff (N)		Phosphor (P)		FS [g]	TS [g]	TS [g]
				a	b	c	b			
2.A	1	36,3	6,98	3,66	255,47	173,1	12,08	35,5	7,43	13,20
	2	30,0	5,62	3,82	214,68	183,2	10,30	39,2	7,83	10,01
	3	31,4	6,53	3,54	231,16	159,0	10,38	33,1	7,20	11,37
	4	37,8	7,65	3,58	273,87	168,5	12,89	38,5	8,44	12,92
	5	32,7	6,33	3,70	234,21	173,5	10,98	39,8	7,95	11,32
	6	22,1	5,25	3,38	177,45	133,3	7,00	22,0	5,11	7,50
	7	27,2	6,12	3,43	209,92	144,3	8,83	25,7	5,82	9,92
	8	26,1	5,28	3,78	199,58	168,8	8,91	45,6	9,74	13,49
	9	23,4	4,99	3,55	177,15	151,4	7,55	28,3	5,98	7,86
	10	23,9	4,58	3,84	175,87	175,9	8,06	40,1	7,94	8,71
2.B	11	37,0	7,43	3,73	277,14	167,2	12,42	38,5	8,60	nb
	12	30,4	6,22	3,75	233,25	168,4	10,47	41,6	9,18	nb
	13	32,9	7,05	3,57	251,69	159,8	11,27	39,6	8,17	nb
	14	28,5	5,78	3,78	218,48	170,6	9,86	45,9	9,35	nb
	15	28,9	6,23	3,59	223,66	162,9	10,15	26,6	6,49	nb
	16	38,5	7,77	3,61	280,50	168,5	13,09	41,8	9,02	nb
	17	30,5	6,59	3,67	241,85	162,3	10,70	34,8	7,98	nb
	18	25,8	5,69	3,60	204,84	161,2	9,17	26,8	5,68	nb
	19	31,1	6,56	3,67	240,75	172,0	11,28	40,9	8,63	nb
	20	26,3	5,54	3,70	204,98	174,1	9,65	34,7	6,95	nb
2.C	21	91,3	17,85	3,82	681,87	198,8	35,49	47,7	9,60	nb
	22	117,8	21,33	4,01	855,33	230,2	49,10	68,6	12,92	nb
	23	122,2	23,3	3,81	887,73	216,6	50,47	73,1	13,09	nb
	24	137,5	25,26	3,89	982,61	222,6	56,23	68,9	13,46	nb
	25	135,7	25,16	3,85	968,66	225,0	56,61	66,1	12,40	nb
2.D	26	117,8	21,1	3,95	833,45	225,6	47,60	93,6	17,41	nb
	27	129,7	24,02	3,90	936,78	229,0	55,01	71,1	13,24	nb
	28	101,4	18,18	3,99	725,38	223,7	40,67	72,9	12,48	nb
	29	92,4	16,93	3,86	653,50	219,2	37,11	55,7	9,69	nb
	30	95,6	17,32	3,96	685,87	217,2	37,62	67,4	11,51	nb
2.E	31	44,8	9,15	3,61	330,32	167,4	15,32	34,2	7,71	14,92
	32	37,8	7,61	3,71	282,33	187,5	14,27	34,5	7,35	11,08
	33	43,1	8,88	3,65	324,12	167,5	14,87	41,3	8,78	12,56
	34	43,2	8,93	3,64	325,05	165,5	14,78	38,3	8,44	13,54
	35	45,5	9,73	3,46	336,66	149,8	14,58	39,5	8,93	14,84
2.F	36	41,6	8,78	3,47	304,67	157,7	13,85	35,7	7,76	nb
	37	32,7	7,59	3,26	247,43	138,1	10,48	27,9	6,40	nb
	38	29,8	6,56	3,44	225,66	156,3	10,25	36,3	7,74	nb
	39	37,9	8,16	3,45	281,52	157,4	12,84	41,0	9,31	nb
	40	24,9	5,87	3,33	195,47	144,7	8,49	33,8	7,20	nb

Tab. 25 (fortgeführt): Zweiter Gewächshausversuch, Rohdaten (105, 135, 217 d)

FS) Frischmasse, TS) Trockenmasse, a) Prozentualer Anteil der oberirdischen TS [%], b) Menge in der oberirdischen TS [mg], c) Gehalt in der oberirdischen TS [mg pro 100 g], nb) nicht bestimmt

Variante	Topf	oberirdische Biomasse (105 d)						oberirdische Biomasse (135 d)		Wurzelmasse (217 d)
		FS [g]	TS [g]	Stickstoff (N)		Phosphor (P)		FS [g]	TS [g]	TS [g]
2.G	41	44,0	9,33	3,45	321,89	161,4	15,06	37,1	8,53	nb
	42	31,3	6,79	3,53	239,69	170,0	11,54	29,7	6,32	nb
	43	39,1	8,89	3,23	287,15	145,0	12,89	29,9	6,77	nb
	44	49,1	10,6	3,30	349,80	151,9	16,10	33,3	8,14	nb
	45	27,7	6,24	3,44	214,66	154,0	9,61	32,7	6,68	nb
2.H	46	30,9	6,6	3,54	233,64	155,5	10,26	38,0	8,04	nb
	47	24,7	5,32	3,63	193,12	163,2	8,68	43,4	8,54	nb
	48	31,4	6,86	3,55	243,53	161,2	11,06	43,4	9,30	nb
	49	23,9	4,86	3,68	178,85	169,4	8,23	41,4	7,84	nb
	50	28,2	6,26	3,44	215,34	154,8	9,69	36,5	7,72	nb
2.I	51	34,4	7,35	3,38	248,43	162,6	11,95	27,9	6,44	nb
	52	35,0	7,46	3,36	250,66	157,9	11,78	29,0	6,82	nb
	53	33,5	7,67	3,31	253,88	151,2	11,60	28,2	7,01	nb
	54	40,3	8,13	3,64	295,93	170,5	13,86	38,9	9,11	nb
	55	37,1	8,65	3,16	273,34	137,1	11,86	28,9	7,07	nb
2.J	56	36,9	8,23	3,33	274,06	155,4	12,79	42,6	9,84	14,50
	57	53,0	12,8	2,96	378,88	130,4	16,69	45,6	10,31	17,37
	58	41,9	9,57	3,29	314,85	149,7	14,33	47,6	11,20	17,78
	59	25,4	5,86	3,38	198,07	153,2	8,98	33,6	7,70	12,25
	60	49,9	11,61	3,05	354,11	132,9	15,43	41,2	9,91	19,58
2.K	61	60,9	15,47	1,20	185,64	271,9	42,06	35,6	8,00	nb
	62	64,4	14,74	1,35	198,99	292,6	43,13	38,4	8,10	nb
	63	71,9	17,41	1,24	215,88	277,2	48,26	37,3	7,88	nb
	64	57,6	13,66	1,28	174,85	290,8	39,72	36,8	8,27	nb
	65	73,7	18,45	1,20	221,40	247,2	45,61	35,4	8,57	nb
2.L	66	52,3	13,36	1,23	164,33	285,1	38,09	37,6	8,73	nb
	67	68,4	16,89	1,20	202,68	260,5	44,00	39,5	9,21	nb
	68	64,4	16,33	1,20	195,96	276,1	45,09	36,2	8,40	nb
	69	58,3	15,22	1,23	187,21	275,5	41,93	32,0	7,89	nb
	70	62,0	16,17	1,21	195,66	260,5	42,12	35,0	8,10	nb

Tab. 26: Dritter Gewächshausversuch, Rohdaten (105 d)

FS) oberirdische Frischmasse, TS) oberirdische Trockenmasse, a) Prozentualer Anteil der oberirdischen TS [%], b) Menge in der oberirdischen TS [mg], c) Gehalt in der oberirdischen TS [mg pro 100 g]

Variante	Topf	FS [g]	TS [g]	Stickstoff (N)		Phosphor (P)		Kalium (K)		Magnesium (Mg)	
				a	b	c	b	c	b	c	b
3.A	1	31,0	7,5	3,17	237,75	115,2	8,64	2738,8	205,4	373,0	27,98
	2	46,1	10,1	3,13	316,13	125,1	12,64	3213,7	324,6	422,7	42,69
	3	17,4	4,1	3,52	144,32	130,6	5,35	2819,3	115,6	439,1	18,00
	4	33,2	7,9	3,14	248,06	123,4	9,75	2859,3	225,9	421,9	33,33
	5	29,0	6,9	3,23	222,87	127,2	8,78	3220,0	222,2	517,4	35,70
3.B	6	17,5	5,2	2,91	151,32	96,8	5,03	2546,9	132,4	406,5	21,14
	7	33,6	8,1	3,22	260,82	115,0	9,32	3307,0	267,9	462,5	37,46
	8	29,3	6,9	3,08	212,52	115,8	7,99	3444,2	237,6	543,4	37,49
	9	42,6	11,3	2,76	311,88	102,3	11,56	2960,8	334,6	439,6	49,67
	10	37,4	8,5	3,14	266,90	131,8	11,20	3855,0	327,7	553,0	47,01
3.C	11	40,1	9,3	3,06	284,58	130,0	12,09	3538,8	329,1	466,5	43,38
	12	43,1	9,8	3,12	305,76	120,4	11,80	3391,1	332,3	444,6	43,57
	13	53,7	13,4	2,78	372,52	102,8	13,78	3123,3	418,5	410,0	54,94
	14	44,3	10,1	2,96	298,96	115,6	11,68	3236,4	326,9	432,8	43,71
	15	25,8	6,7	3,04	203,68	102,2	6,85	2948,7	197,6	418,1	28,01
3.D	16	51,0	9,9	3,41	337,59	151,8	15,03	3785,4	374,8	506,5	50,14
	17	56,0	13,2	3,01	397,32	116,4	15,36	3391,4	447,7	434,4	57,34
	18	38,2	8,9	3,10	275,90	148,6	13,23	3773,1	335,8	586,8	52,23
	19	40,1	10,8	2,72	293,76	100,7	10,88	3074,5	332,0	480,3	51,87
	20	27,3	7,2	2,84	204,48	97,6	7,03	3104,2	223,5	485,8	34,98
3.E	21	5,3	2,0	3,27	65,40	55,1	1,10	3032,2	60,6	472,5	9,45
	22	5,2	1,9	3,19	60,61	54,4	1,03	3486,2	66,2	481,5	9,15
	23	6,7	2,2	3,39	74,58	55,1	1,21	3458,9	76,1	498,0	10,96
	24	4,7	1,8	3,12	56,16	50,9	0,92	3208,3	57,7	504,7	9,08
3.F	26	3,7	1,5	3,23	48,45	53,0	0,80	2872,0	43,1	496,8	7,45
	27	7,5	2,4	3,03	72,72	60,0	1,44	3222,1	77,3	451,8	10,84
	28	12,8	3,3	3,38	111,54	91,7	3,03	3552,1	117,2	436,0	14,39
	30	4,3	1,6	3,33	53,28	53,7	0,86	2735,8	43,8	471,5	7,54

Tab. 27: Stoffwechseleigenschaften des Isolats 2.2 nach VITEK® 2

-) negative Reaktion, +) positive Reaktion, ?) Ergebnis zu nah am Schwellenwert

Test	Ergebnis	Test	Ergebnis
Ala-Phe-Pro-Arylamidase	-	Saccharose	?
Adonitol	-	D-Tagatose	-
L-Pyrrolydonyl-Arylamidase	-	D-Trehalose	-
L-Arabitol	-	Citrat	+
D-Cellubiose	-	Malonat	-
β -Galactosidase	-	5-keto-D-Gluconat	-
H ₂ S Produktion	-	L-Lactat Alkalinisation	-
β -N-Acetyl-Glucosaminidase	-	α -Glucosidase	-
Glutamyl Arylamidase pNA	-	Succinat Alkalinisation	+
D-Glucose	+	β -N-Acetyl-Galactosaminidase	-
γ -Glutamyl-Transferase	-	α -Galactosidase	-
Fermentation von Glucose	-	Phosphatase	-
β -Glucosidase	-	Glycin Arylamidase	-
D-Maltose	-	Ornithin Decarboxylase	-
D-Mannitol	-	Lysin Decarboxylase	-
D-Mannose	+	L-Histidin Assimilation	?
β -Xylosidase	-	Coumarat	+
β -Alanin-Arylamidase pNA	-	β -Glucoronidase	-
L-Prolin Arylamidase	+	O/129 Resistenz	+
Lipase	-	Glu-Gly-Arg-Arylamidase	-
Palatinose	-	L-Malat Assimilation	+
Tyrosin Arylamidase	+	Ellman	-
Urease	-	L-Lactat Assimilation	+
D-Sorbitol	-		

Tab. 28: Antibiotogramm des Isolats 2.2 nach VITEK® 2

Erg.) Ergebnis, S) sensibel, I) intermediär, R) resistent

Antibiotikum	Erg.	Antibiotikum	Erg.
Ampicillin	R	Imipenem	S
Ampicillin/Sulbactam	R	Levofloxacin	S
Cefotaxime	I/R	Meropenem	S
Cefpodoxime	R	Nitrofurantoin	R
Ceftazidime	S	Piperacillin	S
Cefuroxime	R	Piperacillin/Tazobactam	S
Cefuroxime Axetil	R	Tetracycline	S
Ciprofloxacin	S	Tobramycin	S
Gentamicin	S	Trimethoprim/Sulfamethoxazole	S

Tab. 29: Antibiotogramm des Isolats 2.2 (gemäß CLSI, Jan. 2008)

Erg.) Ergebnis, S) sensibel, I) intermediär, R) resistent

Antibiotikum	Erg.	Antibiotikum	Erg.
Doxycyclin	S	Meropenem	S
Cotrimoxazol	S	Aztreonam	S
Ciprofloxacin	S	Ceftriaxon	S
Levofloxacin	S	Ceftazidim	S
Mezlocillin	S	Cefepim	S
Piperacillin	S	Gentamicin	S
Piperacillin/Tazobactam	S	Tobramycin	S
Imipenem	S	Amikacin	S

Teilsequenz der 16S rDNA von Isolat 2.2 (1477 nt):

```
1  AGTCGAGCGG TAGAGAGGTG CTTGCACCTC TTGAGAGCGG CGGACGGGTG AGTAAAGCCT
61  AGGAATCTGC CTGGTAGTGG GGGATAACGC TCGGAAACGG ACGCTAATAC CGCATACGTC
121 CTACGGGAGA AAGCAGGGGA CCTTCGGGCC TTGCGCTATC AGATGAGCCT AGGTCGGATT
181 AGCTAGTTGG TGAGGTAATG GCTCACCAAG GCGACGATCC GTAAGTGGTC TGAGAGGATG
241 ATCAGTCACA CTGGAAGTGA GACACGGTCC AGACTCCTAC GGGAGGCAGC AGTGGGGAAT
301 ATTGGACAAT GGGCGAAAGC CTGATCCAGC CATGCCGCGT GTGTGAAGAA GGTCTTCGGA
361 TTGTAAAGCA CTTTAAGTTG GGAGGAAGGG CATTAAACCTA ATACGTTAGT GTTTTGACGT
421 TACCGACAGA ATAAGCACCG GCTAACTCTG TGCCAGCAGC CGCGGTAATA CAGAGGGTGC
481 AAGCGTTAAT CGGAATTACT GGGCGTAAAG CGCGCGTAGG TGGTTCGTTA AGTTGGATGT
541 GAAATCCCCG GGCTCAACCT GGGAACTGCA TTCAAAACTG TCGAGCTAGA GTATGGTAGA
601 GGGTGGTGGA ATTTCTGTG TAGCGGTGAA ATGCGTAGAT ATAGGAAGGA ACACCAGTGG
661 CGAAGGCGAC CACCTGGACT GATACTGACA CTGAGGTGCG AAAGCGTGGG GAGCAAACAG
721 GATTAGATAC CCTGGTAGTC CACGCCGTAA ACGATGTCAA CTAGCCGTTG GGAGCCTTGA
781 GCTCTTAGTG GCGCAGCTAA CGCATTAAGT TGACCGCCTG GGGAGTACGG CCGCAAGGTT
841 AAAACTCAAA TGAATTGACG GGGGCCCGCA CAAGCGGTGG AGCATGTGGT TTAATTCGAA
901 GCAACGCGAA GAACCTTACC AGGCCTTGAC ATCCAATGAA CTTTCCAGAG ATGGATTGGT
961 GCCTTCGGGA RCATTGAGAC AGGTGCTGCA TGGCTGTCGT CAGCTCGTGT CGTGAGATGT
1021 TGGGTAAAGT CCCGTAACGA GCGCAACCCT TGTCTTAGT TACCAGCACG TMTGGTGGG
1081 CACTCTAAGG AGACTGCCGG TGACAAACCG GAGGAAGGTG GGGATGACGT CAAGTCATCA
1141 TGGCCCTTAC GGCCTGGGCT ACACACGTGC TACAATGGTC GGTACAGAGG GTTGCCAAGC
1201 CGCGAGGTGG AGCTAATCCC ACAAACCGA TCGTAGTCCG GATCGCAGTC TGCAACTCGA
1261 CTGCGTGAAG TCGGAATCGC TAGTAATCGC GAATCAGAAT GTCGCGGTGA ATACGTTCCC
1321 GGGCCTTGTA CACACCGCCC GTCACACCAT GGGAGTGGGT TGCACCAGAA GTAGCTAGTC
1381 TAACCTTCGG GGGGACGGTT ACCACGGTGT GATTCATGAC TGGGGTGAAG TCGTAACAAG
1441 GTAGCCGTAG GGGAACCTGC GGCTGGATCA CCTCCTT
```

Teilsequenz des ACC Deaminase-Gens (*acdS*) von Isolat 2.2 (912 nt):

```
1 TCACCCCCTT GAAGCGTCTC AGCGAACATT TGGGCGGCAA GGTGCAGTTG TATGCTAAGC
61 GTGAAGACTG CAACAGTGGC CTGGCCTTCG GCGGGAACAA AACCCGCAAG CTTGAATACC
121 TGATTCCCGA AGCGCTTGAG CAAGGCTGCG ATACCCTGGT TTCCATCGGC GGAATCCAGT
181 CGAACCAGAC CCGCCAGGTA GCCGCCGTCG CTGCTCACCT GGGCATGAAG TGCCTACTGG
241 TGCAGGAAAA CTGGGTGAAC TACTCCGATG CCGTGTATGA CCGAGTGGGC AATATCGAGA
301 TGTCCCGGAT CATGGGTGCA GAGGTACGTC TGGACGCCGC CGGGTTTGAC ATCGGCATTC
361 GTCCAGTTG GGAGAAGGCC ATGAGCGACG TGATCGAGCG AGGTGGCAAG CCATTCCCGA
421 TCCCGGCGGG GTGTTCCGAG CATCCCTACG GCGGCCTCGG GTTCGTGGGT TTCGCCGAAG
481 AGGTACGGCA GCAGGAAAAA GAACTGGGCT TCAAGTTTGA TTACATTGTG GTCTGTTCCG
541 TGACCGGTAG TACCCAGGCC GGCATGGTGG TCGGTTTCGC TGCCGACGGC CGCTCGAAGA
601 ACGTCATCGG TATCGACGCC TCGGCCAAAC CGGAGCAGAC CAAGGCACAG ATTTTGCGCA
661 TTGCTCGGCA CACCGCTGAG CTGGTGGATC TGGGTCGGGA GATCACTGAA GAGGACGTGG
721 TCCTCGATAC GCGCTTCGCC TACCCGGAAT ATGGCTTGCC CAACGACGGC ACGCTGGAAG
781 CTATCCGACT GTGCGCGAGC CTTGAGGGCG TACTGACAGA CCCGGTGTAT GAAGGTAAAT
841 CCATGCACGG GATGATTGAT ATGGTGCGTC GTGGTGAGTT CCCTGAAGGC TCGAAAGTGC
901 TTTATGCGCA TT
```

Von der *acdS*-Teilsequenz abgeleitete Aminosäure-Sequenz (303 AS):

```
1 TPLKRLSEHL GGVQLYAKR EDCNSGLAFG GNKTRKLEYL IPEALEQGCD TLVSIGGIQS
61 NQTRQVAAVA AHLGKMCVLV QENWVNYSDA VYDRVNIEM SRIMGAEVRL DAAGFDIGIR
121 PSWEKAMSDV IERGGKPFPI PAGCSEHPYG GLGFVGFAEE VRQQEKELGF KFDYIVVCSV
181 TGSTQAGMNV GFAADGRSKN VIGIDASAKP EQTKAQILRI ARHTAELVDL GREITEEDVV
241 LDTRFAYPEY GLPNDGTLEA IRLCASLEGV LTDPVYEGKS MHGMIDMVRR GEFPEGSKVL
301 YAH
```

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Friedrich Schmidt für die Möglichkeit, an dem interessanten Thema zu forschen, und für seine Betreuung und Unterstützung.

Weiterhin danke ich Prof. Dr. Helge Schmeisky für die Kooperations- und Diskussionsbereitschaft, für die Ermöglichung der Gewächshausversuche und selbstverständlich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Prof. Dr. Ewald Langer und Prof. Dr. Kurt Weising gilt mein Dank für ihre Bereitschaft, als Mitglieder der Prüfungskommission zu fungieren.

Großen Dank bin ich Karsten Peters und besonders Manfred Kunick schuldig, ohne die die umfangreichen Gewächshausversuche samt Planung, Durchführung und Auswertung nicht möglich gewesen wären.

Den Abteilungen Entwicklungsbiologie, Pflanzenphysiologie und Zellbiologie danke ich für die Bereitstellung der Mikroskope, der Abteilung Biochemie für die Möglichkeit zur Durchführung der massenspektrometrischen Analysen und der Abteilung Ökologie gilt mein Dank für die Unterstützung bei den Phosphat-Messungen.

Den ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie und hier besonders Albert Dratwinski, Christian Eichler, Dr. Thomas Hoppe, Birgit Jaeger, Martin Lorenz und Karsten Peters danke ich für die gute Atmosphäre im Labor, für ihre Hilfe bei diversen Problemstellungen und ihre Diskussionsbereitschaft.

Dr. Cornelia Janusch, Dr. Susanne Schlüter und Elke Majewski danke ich für das kritische Lesen und Korrigieren der Arbeit (bzw. von Auszügen).

Der K+S Aktiengesellschaft und hier im Besonderen Herrn Dr. J.-H. Sachse danke ich für die finanzielle Unterstützung, die diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht hat.

Meiner Familie und ganz besonders Tine danke ich für alles.

Fachgebiet Landschaftsökologie und Naturschutz

Steinstr. 21 | 37213 Witzenhausen | (FRG)

Schriftenreihe

Ökologie und Umweltsicherung

Heft 1/1992:

Status und Verbreitung des Braunbären (*Ursus arctos*) in Europa sowie Maßnahmen zur Erhaltung der Art.

Bernhard Hörning, 182 Seiten - € 10,00

Heft 2/1993:

Auswirkungen der Werraversalzung auf die ökologischen Verhältnisse der Auenlandschaft des Werratales.

Margit Kahlert, 170 Seiten - € 8,00

Heft 3/1993:

Entwicklung abiotischer Milieufaktoren in einem neuentstehenden See eines ehemaligen Braunkohlentagebaugesbietes in Nordhessen.

Wilma Maria Anna Westermann, 194 Seiten - € 10,00

Heft 4/1993:

Die physikalischen Eigenschaften der Böden von Braunkohleabraumhalden in ihrer Wirkung auf die Begrünung und Erodierbarkeit.

Ali Latif, 238 Seiten - € 10,00

Heft 5/1993:

Die Flora und Vegetation im Uranbergbaurevier Ronneburg - Pflanzensoziologische Untersuchungen an Extremstandorten.

Hartmut Sängler, 227 Seiten und 76 S. Anhang - € 12,00

Heft 6/1994:

Beiträge zur Limnologie von Fließgewässern in der Umgebung Witzenhausens.

M.P.D. Meijering (Ed.), 119 Seiten - € 7,00

Heft 7/1994:

Stark verzögerte Schnittnutzung auf feuchten Grünlandstandorten - Pflanzenbauliche und ökologische Aspekte -.

Bernhard Hübner, 133 Seiten und 51 S. Anhang - € 9,00

Heft 8/1994:

Zur Ökologie des Fließgewässersystems der Nieme - Ein Beitrag zum Naturschutz in Südniedersachsen -.

Peter Haase, 213 Seiten - € 10,00

Heft 9/1994:

Die Fluktuation von Ackerwildkraut-Gesellschaften und ihre Beeinflussung durch Fruchtfolge und Bodenbearbeitungs-Zeitpunkt.

Thomas van Elsen, 414 Seiten - € 16,00

Heft 10/1995:

Oekophysikalische und -chemische Faktoren des Wilhelmshaeuser Bachsystems und ihre Veraenderung durch Nutzungseingriffe.

Ternala Alexander Barus, 139 Seiten - € 9,00

Heft 11/1996:

Beitrag des Weißklees (*Trifolium repens* L.) zur Ertragsbildung von Grünlandnarben unter besonderer Berücksichtigung von Methoden zur Quantifizierung seiner Stickstoff-Fixierungsleistung.

Jochen Neuendorff, 131 Seiten - € 11,00

Heft 12/1997:

Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 1 - Untersuchungen zum Standort, zur Begrünung mit Komposten und zur Gehölzsukzession von Rückstandshalden mit anhydritischen Auflageschichten.

Michael Lücke, 219 Seiten - € 12,00

Heft 13/1997:

Ermittlung zum Nitrataustrag aus Dauergrünland unter Weidenutzung auf Flußmarsch unter besonderer Berücksichtigung von Exkrementstellen.

Ludger Klempt, 229 Seiten - € 12,00

Heft 14/1998:

Sukzession in Gipssteinbrüchen.

Andreas Rolf Schulmeister, 129 Seiten und Anhang - € 11,00

Heft 15/1998:

Auswirkungen unterschiedlicher Nutzungsintensitäten auf die epigäische Arthropodenfauna von Harzer Bergwiesen: Ein Beitrag zur Landnutzungsgeschichte und zum Konfliktfeld Naturschutz-Landwirtschaft.

Claus-Jürgen Vowinkel, 352 Seiten - € 16,00

Heft 16/1999:

Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 2 - Untersuchungen zur Substratandeckung mit geringen Schichtstärken aus Bodenaushub-Wirbelschichtasche-Gemischen und ihre Begrünung.

Günter Podlacha, 200 Seiten - € 13,00

Heft 17/1999:

Strömungsgeschehen, Stoffhaushalt und Gewässergüte im Auenbereich eines salzbelasteten Fließgewässers: Fallstudie eines Naturschutzgebietes im Unteren Werratal.

Wilko Schweers, 352 Seiten - € 15,00

Heft 18/1999:

Zoozönosen, Chemismus und Struktur regionaler Bachtypen im niedersächsischen und nordhessischen Bergland.

Peter Haase, 155 Seiten und Anhang - € 11,00

Heft 19/2000:

Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 3 - Untersuchungen zum Salzaustrag, zur Sukzession sowie Maßnahmen und Erkenntnisse zur Begrünung.

Helge Schmeisky, Hubertus Hofmann (Ed.), 212 Seiten - € 14,00

Heft 20/2001:

Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 4 - Untersuchungen zur Nutzbarkeit aufbereiteter Salzschlacke der Sekundäraluminium-Industrie als Rekultivierungsmaterial einer Kali-Rückstandshalde.

Tobias Scheer, 181 Seiten - € 13,00

Heft 21/2001:

Studien über Mikroalgen in Nordhessen.

Tobias Scheer, Helge Schmeisky (Ed.), 228 Seiten - € 14,00

Heft 22/2001:

Erfolgs- und Leistungsbeurteilung der Selbstverwaltung Deutscher Beregnungsverbände im Hinblick auf die Bildung von Wassernutzungsorganisationen in Brasilien.

Oswaldo König, 231 Seiten - €14,00

Heft 23/2003:

Raum – Zeit – Dynamik von Flora und Vegetation auf Halden des Uranbergbaus.

Hartmut Sänger, 336 Seiten - € 19,00

Heft 24/2004:

Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 5 - Untersuchungen zur Begrünung und zur Sukzession auf einer anhydritisch geprägten Rückstandshalde der Kaliindustrie im Werragebiet.

Hubertus Hofmann, 212 Seiten - € 14,00

Heft 25/2005:

Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 6 - Begrünungsmaßnahmen auf der Rückstandshalde des Kaliwerkes – Sigmundshall in Bokeloh.

Silvia Niessing, 191 Seiten - € 14,00

Heft 26/2005:

Use of compost for crop production in Pakistan.

Ghulam Sarwar, 203 Seiten - €14,00

Heft 27/2007:

Ökologisch-faunistische Fließgewässerbewertung am Beispiel der salzbelasteten unteren Werra und ausgewählter Zuflüsse.

Gerd Hübner, 232 Seiten - € 17,00

Heft 28/2007:

Evolution of effective and economical reclamation technology for salt affected soils using brackish water.

Muhammad Anwar Zaka, 153 Seiten und Anhang - € 11,00

Heft 29/2007:

Salinity/sodicity tolerance of *Acacia ampliceps* and identification of techniques useful to avoid early stage salt stress.

Khalid Mahmood, 183 Seiten und Anhang - € 13,00

Heft 30/2008:

Untersuchungen zum Aufbau einer funktional optimierten Rekultivierungsschicht auf einer hochbasischen Aschendeponie.

Frank Braunisch, 215 Seiten - € 15,00

Heft 31/2010:

Effect of Endomycorrhizal Fungi and Compost of the Yield and Quality of Maize and Sunflower Plants in Poor Nutrients Soil.

Amal Abou El-Goud, 155 Seiten - € 13,00

Heft 32/2010:

Evaluation of the growth of date palm seedlings irrigated with saline water in Sultanat of Oman.

Salim Abdullah Rashid Al Rasbi, 192 Seiten - € 14,00

Heft 33/2010:

Forage production in Panicum grass- legumes intercropping by combining geometrical configuration, inoculation and fertilizer under rainfed conditions.

Muhammad Arshad Ullah, 159 Seiten - € 13,00

Heft 34/2011:

Rekultivierung von Rückstandshalden der Kaliindustrie - 7 - Untersuchung von pflanzenwachstums-fördernden Rhizobakterien sowie deren Nutzbarkeit in der Rekultivierung einer Rückstandshalde der Kaliindustrie.

Sebastian Koch, 147 Seiten - € 15,00